

SKRIPSI

UJI AKTIVITAS ANALGESIK SENYAWA 4-BROMOBENZOILUREA PADA MENCIT PUTIH (*Mus musculus*) DENGAN METODE *WRITHING TEST*



CANINDERA COSTA

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
DEPARTEMEN KIMIA FARMASI
SURABAYA**

2016

SKRIPSI

UJI AKTIVITAS ANALGESIK SENYAWA 4-BROMOBENZOILUREA PADA MENCIT PUTIH (*Mus musculus*) DENGAN METODE *WRITHING TEST*



CANINDERA COSTA
051211131071

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
DEPARTEMEN KIMIA FARMASI
SURABAYA
2016**

**LEMBAR PERSETUJUAN
PUBLIKASI KARYA ILMIAH**

Demi perkembangan ilmu pengetahuan, saya menyetujui skripsi/karya ilmiah saya, dengan judul :

**UJI AKTIVITAS ANALGESIK SENYAWA
4-BROMOBENZOILUREA PADA MENCIT PUTIH (*Mus musculus*)
DENGAN METODE WRITHING TEST**

untuk dipublikasikan atau ditampilkan di internet, digital library Perpustakaan Universitas Airlangga atau media lain untuk kepentingan akademik sebatas sesuai dengan Undang-Undang Hak Cipta.

Demikian pernyataan persetujuan publikasi skripsi/karya ilmiah saya buat dengan sebenar-benarnya.

Surabaya, Oktober 2016



Canindera Costa
051211131071

SURAT PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama : Canindera Costa

NIM : 051211131071

Fakultas : Farmasi

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa hasil tugas akhir yang saya tulis dengan judul :


**UJI AKTIVITAS ANALGESIK SENYAWA
4-BROMOBENZOILUREA PADA MENCIT PUTIH (*Mus musculus*)
DENGAN METODE WRITHING TEST**

adalah benar – benar hasil karya saya sendiri. Apabila dikemudian hari diketahui bahwa skripsi ini merupakan hasil plagiarisme, maka saya bersedia menerima sanksi berupa pembatalan kelulusan dan atau pencabutan gelar yang saya peroleh.

Demikian surat pernyataan ini saya buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Surabaya, Oktober 2016




Canindera Costa
051211131071

Lembar Pengesahan

**UJI AKTIVITAS ANALGESIK SENYAWA
4-BROMOBENZOILUREA PADA MENCIT
PUTIH (*Mus musculus*) DENGAN METODE WRITHING TEST**

SKRIPSI

**Dibuat Untuk Memenuhi Syarat Mencapai Gelar Sarjana
Farmasi pada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga**

Surabaya

2016

Oleh :

CANINDERA COSTA

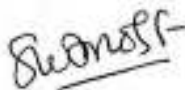
051211131071

Skripsi ini telah disetujui

Oktober 2016

Disetujui oleh :

Pembimbing Utama,



Prof. Dr. Siswandono, M.S., Apt.

NIP. 195210021980021001

Pembimbing Serta,



Dr. Suko Hardjono, MS., Apt.

NIP. 195209281981031001

KATA PENGANTAR

Segala puji kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat serta ridha-Nya kepada kami dalam usaha dan kerja sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi dengan judul **“Uji Aktivitas Analgesik Senyawa 4-Bromobenzoilurea pada Mencit Putih (*Mus musculus*) dengan Metode *Writhing Test*”**. Skripsi ini disusun untuk memenuhi persyaratan mencapai gelar sarjana farmasi di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

Dalam menempuh studi sarjana farmasi dan penulisan skripsi, penulis mendapatkan banyak bantuan dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis dengan tulus ikhlas menyampaikan terima kasih kepada:

- Allah SWT atas karunia, rahmat, ridha, hidayah dan nikmatnya, karena hanya atas kehendak-Nyalah skripsi ini dapat diselesaikan.
- Kedua orang tua penulis, bapak Ir. Suparno dan ibu Dra. Yenny Rosita, serta saudara-saudara yang telah memberikan dukungan moral, doa dan material.
- Rektor Universitas Airlangga Prof. Dr. Mohammad Nasih, SE., MT., Ak., CMA., atas kesempatan yang diberikan untuk menyelesaikan program studi sarjana farmasi kepada penulis.
- Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Dr. Umi Athijah, MS., Apt. atas kesempatan yang diberikan untuk menyelesaikan program studi sarjana farmasi kepada penulis.

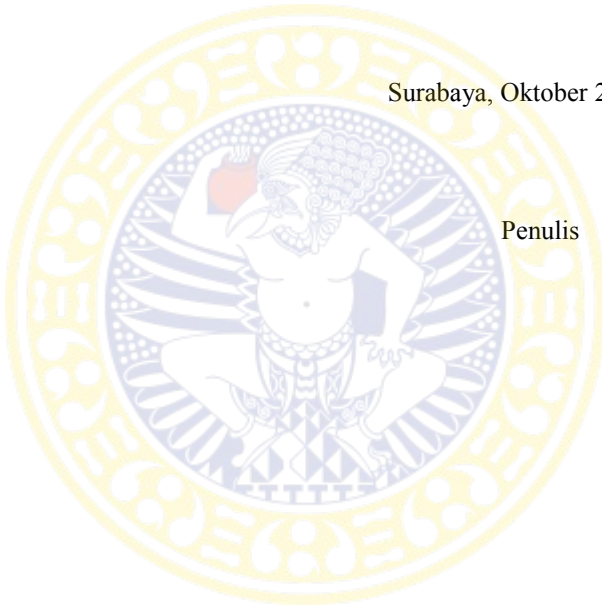
- Prof. Dr. Siswandono, MS., Apt. dan Dr. Suko Hardjono, MS., Apt. selaku dosen pembimbing utama dan dosen pembimbing serta skripsi yang telah membimbing penulis hingga dapat menyelesaikan skripsi ini.
- Dra. Esti Hendradi, M.Si., Ph.D., Apt., dan Dini Retnowati, S.farm., M.Si., Apt. selaku dosen wali penulis yang sudah memberikan bimbingan perhatian serta dukungan moral hingga penulis dapat menyelesaikan studi.
- Dr. Juni Ekowati, M.Si., Apt., dan Dra. Asri Darmawati, MS., Apt. selaku dosen penguji yang sudah memberikan bantuan berupa saran, masukan dan kritik yang membangun kepada penulis.
- Ratu Anisa yang mendampingi dan memberikan dukungan dari awal menempuh sarjana farmasi hingga akhir studi dan seterusnya.
- Mohan Bhakti yang sudah memberikan dukungan moral dan membantu pengerjaan penelitian ini.
- Teman-teman seperjuangan skripsi Satrio, Romdani, Yunita, Vagen, Selinda, Vivi, Fauziah, Putri, Fili, Nitiya, Faseh yang telah membantu kelancaran terselesaikannya penelitian ini.
- Bapak laboran Pak Tukijo dan pak Tanto yang sudah bekerja sama dengan baik pada setiap waktu kerja.
- Pihak-pihak lain yang tidak dapat disebutkan satu-per-satu karena telah memberikan dorongan dan bantuan baik secara langsung maupun tidak langsung hingga skripsi ini selesai.

Seorang manusia tidak akan pernah luput dari kesalahan, maka hanya pintu maafilah yang penulis harapkan atas kesalahan-kesalahan yang dilakukan penulis karena kesempurnaan hanya milik Allah SWT. Dengan

segala kerendahan hati, penulis berharap agar apa yang ada dalam skripsi ini dapat bermanfaat dan berguna bagi pembaca sebagai sumbangan pikiran dalam berprestasi untuk agama, bangsa dan negara.

Surabaya, Oktober 2016

Penulis



RINGKASAN

UJI AKTIVITAS ANALGESIK SENYAWA 4-BROMBENZOILUREA PADA MENCIT PUTIH (*Mus musculus*) DENGAN METODE *WRITHING TEST*

Canindera Costa

Penemuan obat baru bertujuan untuk pengobatan suatu jenis penyakit tertentu, meningkatkan aktivitas obat, menurunkan efek samping yang merugikan atau toksisitas, dan meningkatkan selektivitas obat. Senyawa-senyawa tertentu dapat dikembangkan menjadi obat seperti turunan tiourea dan urea yang mempunyai aktivitas biologis yang luas contohnya adalah analgesik. Melalui penelitian pendahuluan senyawa turunan benzoilurea terhadap mencit putih (*Mus musculus*) didapatkan bahwa senyawa tersebut menimbulkan efek CNS depresan. Salah satu golongan obat yang dapat bekerja pada sistem saraf pusat adalah analgesik.

Pada penelitian ini disintesis turunan benzoilurea yang mengandung gugus bromo di posisi para dengan sifat lipofilik, steril dan elektronik yang makin besar dibandingkan dengan senyawa induk. Senyawa hasil sintesis yakni, 4-bromobenzoil urea diharapkan memiliki aktivitas analgesik yang lebih baik dibanding senyawa induk benzoilurea.

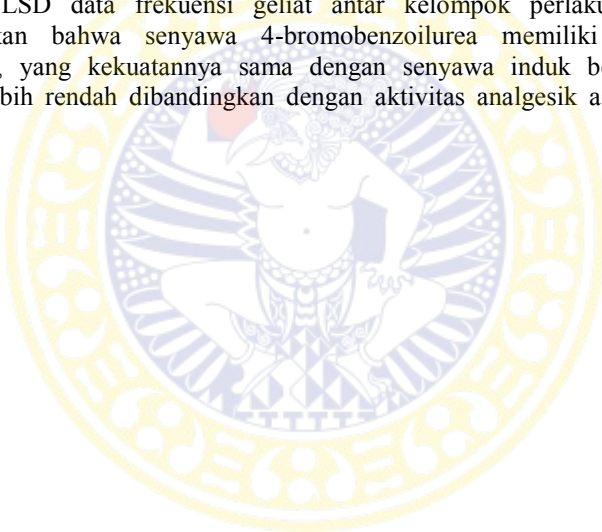
Telah dilakukan sintesis senyawa 4-bromobenzoilurea pada penelitian ini melalui reaksi *Schotten-Baumann* dengan mereaksikan 4-bromobenzoil klorida dan urea dengan penambahan basa trietilamin sebagai katalis dan pengikat HCl yang terbentuk sebagai hasil samping reaksi serta menggunakan pelarut tetrahidrofur.

Senyawa hasil sintesis direkristalisasi menggunakan etanol panas. Dari hasil rekristalisasi, diperoleh zat berbentuk kristal jarum kecil berwarna putih dan tidak berbau. Dilakukan uji kemurnian terhadap senyawa 4-bromobenzoilurea hasil sintesis dengan analisis kromatografi lapis tipis dan penentuan jarak lebur. Dari hasil kedua uji tersebut dimana pada KLT senyawa hasil sintesis menunjukkan noda tunggal pada tiga fase gerak berbeda, dan pada penentuan jarak lebur senyawa hasil sintesis memiliki jarak $<2^{\circ}\text{C}$ sehingga dapat disimpulkan senyawa hasil sintesis murni.

Konfirmasi struktur senyawa hasil sintesis dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan spektrofotometer infrared, berdasarkan hasil dari kedua analisis kualitatif tersebut dapat dinyatakan bahwa senyawa hasil sintesis adalah 4-bromobenzoilurea.

Uji aktivitas analgesik senyawa dilakukan dengan metode *writhing test*, yaitu metode penghambatan nyeri dengan mengamati frekuensi geliat mencit menggunakan larutan asam asetat 0,6% sebagai penginduksi nyeri. Setiap senyawa uji diberikan pada tiga tingkat dosis berbeda 50, 100, dan 200 mg/kg BB. Potensi aktivitas analgesik berupa frekuensi geliat senyawa hasil sintesis akan dibandingkan secara statistik *one-way ANOVA* dengan senyawa induk benzoilurea, asam asetil salisilat dan kontrol CMC-Na.

Hasil uji aktivitas analgesik menunjukkan bahwa senyawa 4-bromobenzoilurea, benzoilurea dan asam asetil salisilat pada tiga dosis yang berbeda berturut-turut adalah 22,25%; 44,74%; 56,46%; 21,77; 43,78%; 54,07% dan 32,78%; 58,13%; 77,51%. Untuk harga ED_{50} dari senyawa 4-bromobenzoilurea, benzoilurea, dan asam asetil salisilat adalah 143,14; 154,54 dan 82,70 mg/kg BB. Dari hasil analisis *one-way ANOVA* dan uji LSD data frekuensi geliat antar kelompok perlakuan dapat disimpulkan bahwa senyawa 4-bromobenzoilurea memiliki aktivitas analgesik, yang kekuatannya sama dengan senyawa induk benzoilurea namun lebih rendah dibandingkan dengan aktivitas analgesik asam asetil salisilat.



ABSTRACT

The Analgesic Activity Test of 4-Bromobenzoylurea Compound in Mice (*Mus musculus*) Using Writhing Test Method

The research purposed to synthesize 4-Bromobenzoylurea and to determine its analgesic activity in mice (*Mus musculus*) using writhing test method was done. The Schotten-Baumann reaction was used for reaction between 4-bromobenzoylchloride and urea with adding trietilamine base. It could be concluded that the product was pure from the result of Thin Layer Chromatography and melting point analysis. According to the result of infrared and ultraviolet spectrophotometric analysis, it was concluded that the synthesized compound was 4-bromobenzoylurea. The analgesic activity was tested using writhing test method in three different doses 50, 100 and 200 mg/kg mice body-weight. The result of analgesic activity test was writhing frequency, which was analyzed to determine pain-inhibition percentage and then ED_{50} . The pain-inhibition percentage of 4-bromobenzoylurea, benzoylurea, and acetic salicylic acid compound, each in three different doses was 22,25%; 44,74%; 56,46%; 21,77; 43,78%; 54,07% and 32,78%; 58,13%; 77,51%. The ED_{50} of 4-bromobenzoylurea, benzoylurea, and acetic salicylic acid was 143,14; 154,54 and 82,70 mg/kg mice body-weight. According to the result of writhing frequency one-way analysis of variance and LSD test, it could be concluded that the 4-bromobenzoylurea compound has the analgesic activity, that as strong as benzoylurea compound but weaker than acetic salicylic acid analgesic activity.

Keyword : 4-Bromobenzoylurea, Benzoylurea, Writhing test.

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	vii
RINGKASAN	x
<i>ABSTRACT</i>	xii
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xviii
DAFTAR GAMBAR	xix
DAFTAR LAMPIRAN	xxi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	7
1.3 Tujuan Penelitian	7
1.3.1 Tujuan Umum	7
1.3.2 Tujuan Khusus	7
1.4 Manfaat Penelitian	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1 Tinjauan Mengenai Nyeri	9
2.2 Tinjauan Mengenai Analgesik	10
2.2.1 Tinjauan Mengenai Analgesik Perifer..	10
2.2.2 Tinjauan Mengenai Analgesik Opioid .	11
2.2.3 Tinjauan Mengenai Asetosal	12
2.3 Tinjauan Mengenai Benzoiurea dan Turunannya	13
2.4 Tinjauan Mengenai Reaksi Asilasi	13

2.5	Tinjauan Mengenai Sintesis Senyawa	
	4-bromobenzoilurea	15
2.6	Tinjauan Mengenai Bahan Sintesis	15
2.6.1	Urea	15
2.6.2	4-Bromobenzoil klorida	16
2.7	Tinjauan Mengenai Analisis Kemurnian	
	Senyawa	16
2.7.1	Organoleptis	16
2.7.2	Jarak Lebur	16
2.7.3	Kromatografi Lapis Tipis	17
2.8	Tinjauan Mengenai Konfirmasi Struktur	
	Senyawa	18
2.8.1	Konfirmasi Struktur Dengan Spektrofotometer Ultra Violet	18
2.8.2	Konfirmasi Struktur Dengan Spektrofotometer Inframerah	18
2.9	Tinjauan Mengenai Uji Aktivitas Analgesik	19
2.9.1	Metode Stimulasi Panas	20
2.9.2	Metode Stimulasi Listrik	21
2.9.3	Metode Stimulasi Tekanan	21
2.9.4	Metode Stimulasi Kimiawi	22
2.10	Tinjauan Mengenai ANOVA	23
BAB III	KERANGKA KONSEPTUAL	24
3.1	Kerangka Konseptual	24
3.2	Skema Kerangka Konseptual	25
3.3	Hipotesis Penelitian	27

BAB IV	METODOLOGI PENELITIAN	28
4.1	Jenis Penelitian	28
4.2	Tempat dan Waktu Penelitian	28
4.2.1	Tempat Penelitian	28
4.2.2	Waktu Penelitian	28
4.3	Bahan Penelitian	28
4.3.1	Bahan Kimia	28
4.3.2	Hewan Percobaan	29
4.4	Instrumen Penelitian	29
4.5	Metode Penelitian	30
4.6	Sintesis Senyawa Turunan Benzoilurea:	
	4-Bromobenzoilurea	31
4.6.1	Prosedur Sintesis	31
4.6.2	Rekristalisasi	32
4.7	Uji Kemurnian Senyawa Hasil Sintesis	32
4.7.1	Pemeriksaan Organoleptis Senyawa Hasil Sintesis	32
4.7.2	Analisis Dengan Kromatografi Lapis Tipis	32
4.7.3	Penentuan Jarak Lebur	33
4.8	Konfirmasi Struktur Senyawa Hasil Sintesis	34
4.8.1	Analisis Dengan Spektrofotometer UV-Vis	34
4.8.2	Analisis Dengan Spektrofotometer Inframerah	34
4.9	Uji Aktivitas Analgesik Senyawa 4-bromobenzoilurea	34

	4.9.1	Preparasi Larutan Asam Asetat 0,6% dan Mucilago Natrium-karboksimetilselulosa 0,5% b/v	37
	4.9.2	Preparasi Sediaan Uji	37
	4.9.3	Perhitungan Dosis	37
	4.10	Analisis Data	38
BAB V		HASIL PENELITIAN	40
	5.1	Persentase Senyawa Hasil Sintesis	40
	5.2	Analisis Kualitatif Senyawa Hasil Sintesis	40
	5.2.1	Analisis Kualitatif Senyawa Dengan Pemeriksaan Organoleptis	40
	5.2.2	Analisis Kualitatif Dengan Pemeriksaan Jarak Lebur	40
	5.2.3	Analisis Kualitatif Dengan Kromatografi Lapis Tipis	41
	5.2.4	Analisis Kualitatif Dengan Spektrofotometer UV-Vis	42
	5.3	Konfirmasi Struktur Senyawa Hasil Sintesis Dengan Spektrofotometer IR	44
	5.4	Uji Aktivitas Analgesik	47
	5.4.1	Penentuan Frekuensi Geliat	48
	5.4.2	Analisis Data Dengan <i>One-way ANOVA</i>	49
	5.4.3	Perhitungan Persentase Hambatan Nyeri	51
	5.4.4	Penentuan ED ₅₀	52
BAB VI		PEMBAHASAN	55
BAB VII		KESIMPULAN DAN SARAN	62
	7.1	Kesimpulan	62

7.2	Saran	62
DAFTAR PUSTAKA	63
LAMPIRAN	67



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel V.1	Hasil Pemeriksaan Organoleptis Senyawa Hasil Sintesis 40
Tabel V.2	Hasil Penentuan Jarak Lebur Senyawa Hasil Sintesis 41
Tabel V.3	Nilai Rf Senyawa 4-Bromobenzoilurea Hasil Sintesis dalam Tiga Macam Fase Gerak 42
Tabel V.4	Karakteristik Spektra Inframerah Senyawa Awal 4- Bromobenzoil klorida dan Senyawa 4-Bromobenzoilurea Hasil Sintesis 46
Tabel V.5	Perbandingan Spektra IR Senyawa Benzoilurea yang digunakan Uji Aktivitas Analgesik dengan Senyawa Benzoilurea Siswandono, 1999 47
Tabel V.6	Frekuensi Geliat Pada Kelompok Uji 4-Bromobenzoilurea, Kelompok Pembanding Benzoilurea dan Asam Asetil Salisilat serta Kelompok Kontrol CMC-Na 0,5 % 49
Tabel V.7	<i>Post-Hoc Tests</i> Antar Kelompok Perlakuan Senyawa Pembanding Asam Asetil Salisilat, Senyawa Uji 4- Bromobenzoilurea, Senyawa Pembanding Benzoilurea dan Kontrol CMC-Na 50
Tabel V.8	Persentase Hambatan Nyeri Kelompok Senyawa Uji 4- Bromobenzoilurea, Senyawa Pembanding Benzoilurea dan Asam Asetil Salisilat 51
Tabel V.9	ED ₅₀ Aktivitas Analgesik Senyawa Uji 4-Bromo benzoilurea, Benzoilurea dan Asam Asetil Salisilat 54

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1.1	Kemiripan struktur kimia senyawa-senyawa dengan gugus farmakofor ureida asiklik 3
Gambar 1.2	Perbandingan struktur benzoilurea dan benzoiltiourea 3
Gambar 2.1	Perbandingan struktur Benzoilurea dan asam barbiturat 13
Gambar 2.2	Mekanisme reaksi asilasi 14
Gambar 2.3	Rancangan sintesis senyawa 4-bromobenzoilurea..... 15
Gambar 2.4	Struktur kimia urea 15
Gambar 2.5	Struktur senyawa 4-bromobenzoilklorida..... 16
Gambar 3.1	Skema kerangka konseptual 26
Gambar 4.1	Kerangka operasional 31
Gambar 4.2	Skema prosedur uji aktivitas analgesik..... 36
Gambar 5.1	Spektra Uv-Vis Senyawa 4-Bromobenzoil klorida dalam Etanol 43
Gambar 5.2	Spektra UV-Vis Senyawa 4-Bromobenzoilurea dalam Etanol 43
Gambar 5.3	Spektra Inframerah Senyawa 4-Bromobenzoil klorida dalam Pelet KBr 45
Gambar 5.4	Spektra Inframerah Senyawa 4-Bromobenzoilurea Hasil Sintesis dalam Pelet KBr 45
Gambar 5.5	Spektra Inframerah Senyawa 4-Benzoilurea dalam Pelet KBr 46

Gambar 5.6	Kurva Hubungan Antara log Dosis Vs % Hambatan Nyeri Senyawa Uji 4-Bromobenzoilurea 52
Gambar 5.7	Kurva Hubungan Antara log Dosis Vs % Hambatan Nyeri Senyawa Pembanding Benzoilurea 53
Gambar 5.8	Kurva Hubungan Antara log Dosis Vs % Hambatan Nyeri Senyawa Pembanding Asam Asetil Salisilat ... 53



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Mekanisme Reaksi Asilasi dengan Basa Trietilamin	69
Lampiran 2 Perhitungan Persentase Senyawa Hasil Sintesis	70
Lampiran 3 Hasil Analisis <i>one-way ANOVA</i>	71
Lampiran 4 Hasil Analisis Uji LSD	73
Lampiran 5 Perhitungan % Hambatan Nyeri	75
Lampiran 6 Cara Perhitungan ED_{50}	77
Lampiran 7 Tabel F	78
Lampiran 8 Tabel r	79
Lampiran 9 Foto Geliatan mencit	80
Lampiran 10 Spektra Inframerah Senyawa 4-Bromobenzoilurea dalam Pelet KBr (Siswandono, 1999)	81
Lampiran 11 Spektra Inframerah Senyawa Benzoilurea dalam Pelet KBr (Siswandono, 1999)	82
Lampiran 12 Hasil Uji Etik Hewan Penelitian	83

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Nyeri didefinisikan oleh Asosiasi Internasional Studi Nyeri sebagai pengalaman sensorik dan emosional yang tidak menyenangkan terkait dengan potensi kerusakan jaringan atau aktual (Sweetman, 2009). Analgetika atau obat penghilang nyeri adalah zat-zat yang mengurangi atau menghalau rasa nyeri tanpa menghilangkan kesadaran (perbedaan dengan anestetika umum) (Tjay, 2007). Semua orang merasakan nyeri, dan terapi dini dari nyeri dianggap penting karena nyeri yang tidak teratasi dapat mempengaruhi psikologi pasien, dan nyeri akut yang tidak ditanggulangi dengan baik dapat menjadi nyeri kronik (Sweetman, 2009).

Parasetamol dan obat golongan anti-inflamasi non-steroid adalah analgesik pilihan pertama untuk mengatasi nyeri ringan sampai sedang, juga digunakan pada nyeri sedang sampai berat untuk mempotensiasi efek opioid (Sweetman, 2009). Parasetamol merupakan senyawa turunan *p*-aminofenol, bekerja menghambat prostaglandin secara lemah pada reseptor siklooksigenase (COX) yaitu COX-1, bersifat selektif terhadap COX-2 pada jaringan sentral dan memiliki efek perifer yang sangat kecil (Furst and Ulrich, 2007). Metabolit toksik parasetamol yaitu *N*-asetil-*p*-benzokuinonimin (NAPQI) bersifat reaktif dapat berikatan dengan sel jaringan hati secara *irreversible*. Penggunaan parasetamol dalam dosis besar dan jangka waktu yang lama dapat menimbulkan kerusakan hati (hepatotoksik) (Burke *et al*, 2006).

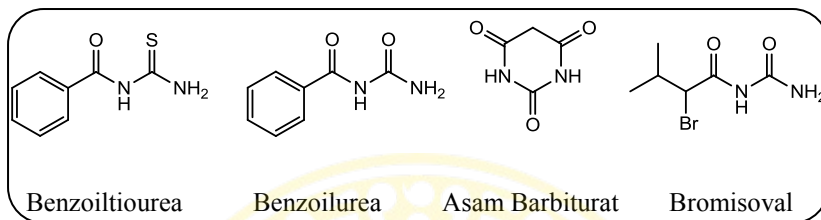
Penemuan obat baru bertujuan untuk pengobatan suatu jenis penyakit tertentu, meningkatkan aktivitas obat, menurunkan efek samping yang

merugikan atau toksisitas, dan meningkatkan selektivitas obat. Senyawa-senyawa tertentu dapat dikembangkan menjadi obat seperti turunan tiourea dan urea yang mempunyai aktivitas biologis yang luas; sebagai antivirus, anti-HIV, antibakteri, maupun aktivitasnya sebagai analgesik dan anti-inflamasi (Kachhadia *et al*, 2004; Alagarsamy *et al*, 2004; Kossakowski dan Struga, 2006; Limban *et al*, 2008).

Melalui penelitian pendahuluan penapisan farmakologis benzoilurea terhadap mencit putih (*Mus musculus*) didapatkan bahwa senyawa tersebut menimbulkan efek hipnotik lemah, depresi dan gangguan koordinasi gerak, sehingga dapat dijadikan senyawa induk untuk dikembangkan lebih lanjut aktivitasnya pada sistem saraf pusat, melalui modifikasi struktur (Siswandono, 1999). Aktivitas sebagai penekan susunan saraf dari senyawa aktif tersebut dikarenakan adanya gugus farmakoforik yang dimiliki oleh senyawa bahan aktif yaitu adanya gugus ureida asiklik, yang ternyata gugus tersebut juga dimiliki oleh senyawa obat golongan penekan susunan saraf pusat yaitu asam barbiturat (Purwanto, 2013). Golongan-golongan obat yang bekerja pada sistem saraf pusat antara lain sedatif-hipnotik, alkohol, anti-kejang, anestesi, relaksan otot, anti-parkinson, anti-psikotik, anti-depresan dan analgesik (opioid) (Katzung, 2012).

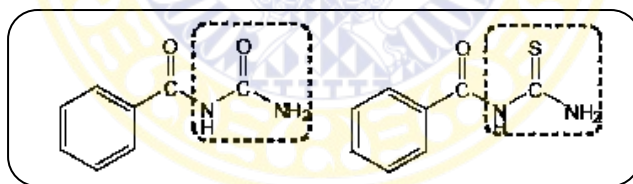
Modifikasi struktur urea yang telah dilakukan, antara lain adalah asilasi dengan benzoilklorida pada salah satu gugus amino dari tiourea dan senyawa turunan benzoiltiourea ini menunjukkan aktivitas penekan sistem saraf pusat (Suzana dkk, 2004). Diduga karena benzoiltiourea mempunyai struktur ureida asiklik yang mirip dengan struktur bromisoval atau turunan barbiturat. Bromisoval adalah sedatif-hipnotik turunan ureida asiklik, tidak dianjurkan untuk pengobatan jangka panjang karena dapat menimbulkan bromisme (Tjay dan Rahardja, 2007).. Penelitian dilanjutkan dengan

turunan senyawa benzoiltiourea dari hasil sintesis ternyata menunjukkan aktivitas sebagai analgesik dan anti inflamasi (Budiati dkk, 2010). Kemiripan struktur benzoiltiourea dan benzoilurea dengan bromisoval dan asam barbiturat dapat dilihat pada Gambar 1.1



Gambar 1.1 Kemiripan struktur kimia senyawa-senyawa dengan gugus farmakofor ureida asiklik

Kemiripan struktur kimia dari benzoilurea dengan benzoiltiourea, yakni penggantian atom O pada benzoilurea dengan atom S seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1.2 akan terbentuk senyawa benzoiltiourea yang telah dibuktikan mempunyai aktivitas analgesik dan anti-inflamasi (Budiati dkk, 2010).



Gambar 1.2 Perbandingan struktur benzoilurea dan benzoiltiourea

Pengembangan lebih lanjut dari senyawa turunan benzoiltiourea memicu untuk menguji coba senyawa turunan benzoilurea dengan gugus farmakofor ureida asiklik yang diperkirakan juga akan memiliki aktivitas farmakologis analgesik. Dari penelitian Siswandono, 1999, aktivitas farmakologis senyawa-senyawa dipengaruhi oleh sifat lipofilik dan

elektronik. Peningkatan sifat lipofilik dapat dilakukan dengan memasukkan gugus non polar, seperti gugus alkil pada cincin aromatik turunan benzoilurea. Untuk meningkatkan sifat elektronik dapat dilakukan dengan memasukkan substituen yang bersifat elektronegatif, seperti gugus halogen, ke dalam cincin aromatik (Siswandono, 1999).

Pada penelitian ini disintesis turunan benzoilurea yang mengandung gugus bromo di posisi para dengan sifat lipofilik ($\pi +$) dan elektronik ($\sigma +$) yang makin besar dibandingkan dengan senyawa induk. Senyawa hasil sintesis yakni, 4-bromobenzoilurea memiliki lipofilisitas yang lebih baik dengan adanya gugus non-polar sebagai alkil pada cincin aromatis sehingga diharapkan dapat lebih mudah menembus membran bilayer dan substituen bromo juga meningkatkan sifat elektronik karena merupakan gugus halogen yang bersifat elektronegatif sehingga mempengaruhi interaksi obat dengan reseptor serta substituen pada posisi para- yang bersifat obstruktif dapat memperlambat metabolisme obat sehingga diperkirakan akan memperpanjang masa kerja obat (Siswandono dan Soekardjo, 2008).

Pembuktian sifat lipofilik dan sterik yang meningkat dapat ditinjau dari harga ClogP dan harga CMR dengan bantuan software ChemBioDraw 12.0 dari masing-masing senyawa. Senyawa induk benzoilurea memiliki harga ClogP sebesar 1,015; CMR sebesar 4,025 dan $\sigma_H = 0,00$. Modifikasi struktur senyawa induk dengan penambahan substituen bromo pada posisi para mempengaruhi sifat fisika dan kimia senyawa seperti ClogP menjadi 2,079; CMR menjadi 5,202 dan $\sigma_{Br} = 0,23$. Dari data yang diperoleh tersebut dapat diprediksi senyawa 4-bromobenzoilurea lebih baik dalam menembus membran bilayer, ikatan antara obat dan reseptor lebih stabil karena sifat lipofilisitas, elektronik dan steriknya meningkat sehingga

diharapkan memiliki aktivitas farmakologis yang lebih baik dibanding senyawa induk benzoilurea.

Prediksi aktivitas analgesik senyawa dan gambaran daya ikat obat dengan reseptor diperkuat dengan dilakukannya uji *in silico* simulasi komputasi *docking* sebelum melakukan sintesis senyawa. Energi interaksi molekul antara reseptor dan ligan (senyawa) pada uji ini dilakukan dengan melihat nilai *Rerank Score* (Hardjono, 2013). Studi *in silico* ini dilakukan *docking* dengan menggunakan program komputer Molegro Virtual Docker versi 5 dengan protein target siklooksigenase 2 (COX-2). Beberapa contoh reseptor COX-2 seperti 3PGH, 4COX, dan 1CX2 dapat digunakan untuk studi *in silico*, namun dalam penelitian ini digunakan reseptor COX-2 dengan kode 1CX2 yang memiliki ligan standar selekoksib dimana selekoksib merupakan obat analgesik selektif COX-2. Percobaan *docking* antara senyawa induk benzoilurea dengan COX-2 pada *cavity* 3, diperoleh harga *rerank score* sebesar -67,4286 sedangkan nilai *docking* 4-bromobenzoilurea dengan COX-2 diperoleh harga *rerank score* sebesar -68,275. Disisi lain, harga *rerank score* pada pecobaan *docking* antara asam asetil salisilat obat analgesik yang telah beredar dipasaran dengan COX-2 sebesar -76,7166 .

Semakin kecil *rerank score* maka energi yang dibutuhkan untuk interaksi antara obat-reseptor juga makin kecil sehingga makin stabil ikatan obat-reseptor tersebut. Dari hasil uji *in silico* di atas dapat disimpulkan bahwa senyawa 4-bromobenzoilurea diprediksikan memiliki aktivitas analgesik yang lebih tinggi dibanding senyawa induk benzoilurea dan mendekati aktivitas analgesik asetosal, sehingga layak untuk diuji.

Untuk mendapatkan senyawa 4-bromobenzoilurea dilakukan sintesis terlebih dahulu yang dilakukan sekali tanpa adanya replikasi, yakni dengan

melakukan reaksi asilasi salah satu gugus amin dari urea dengan pereaksi 4-bromobenzoil klorida. Ada beberapa metode reaksi asilasi, antara lain metode pencampuran fisik, dan reaksi Schotten-Baumann dengan menggunakan pelarut tertentu, seperti piridina atau tetrahidrofuran (Mc Murry, 2015). Sintesis senyawa ini sudah pernah dilakukan oleh Siswandono, 1999, menggunakan reaksi Schotten-Baumann termodifikasi dengan pelarut tetrahidrofuran tanpa penambahan basa seperti trietilamin.

Presentase senyawa hasil sintesis dengan metode pencampuran fisik relatif kecil sedangkan dengan reaksi Schotten-Baumann semua bahan pereaksi harus terlarut dalam pelarut yang digunakan saat mereaksikan (Mc Murry, 2015). Mengingat bahwa urea tidak dapat larut dalam pelarut yang digunakan (tetrahidrofuran), maka dalam mendapatkan turunan benzoilurea ini digunakan reaksi Schotten-Baumann termodifikasi. Substitusi benzoilklorida terhadap gugus amin akan menghasilkan senyawa baru dengan melepas asam klorida. Asam klorida yang dilepaskan akan ditangkap oleh basa trietilamin atau basa organik piridin (Clayden, 2012).

Senyawa hasil sintesis diuji kemurniannya dengan penentuan jarak lebur dan kromatografi lapis tipis dengan menggunakan tiga fasa gerak yang kepolarannya berbeda. Konfirmasi struktur dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV dan inframerah (IR) (Silverstein *et al.*, 2005; Pavia *et al.*, 2009). Senyawa hasil sintesis juga diuji aktivitas analgesiknya menggunakan metode *writhing test* dengan pembandingan senyawa induk benzoilurea untuk membuktikan studi *in silico* serta obat asetosal yang sudah terbukti aktivitas analgesiknya, pada mencit putih (*Mus musculus*).

Data frekuensi geliat yang diperoleh dari uji aktivitas kemudian diolah menggunakan uji statistik *one-way ANOVA* dengan bantuan software komputer SPSS 13.0 untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan

aktivitas analgesik yang bermakna pada ketiga senyawa. Kemudian, data frekuensi geliat dianalisis untuk diperoleh harga % hambatan nyeri, semakin besar % hambatan nyeri semakin kuat aktivitas analgesik senyawa. Data hasil uji aktivitas analgesik ketiga senyawa dinyatakan dengan harga ED_{50} yang diperoleh dengan cara substitusi pada persamaan regresi linier hubungan antara log dosis dan % hambatan nyeri pada masing-masing senyawa.

1.2 Rumusan Masalah

- Apakah senyawa 4-bromobenzoilurea mempunyai aktivitas analgesik pada mencit putih (*Mus musculus*) dengan metode *writhing test*?
- Bagaimana aktivitas analgesik senyawa 4-bromobenzoilurea dibanding aktivitas analgesik senyawa induk benzoilurea pada mencit putih (*Mus musculus*) dengan metode *writhing test*?
- Bagaimana aktivitas analgesik senyawa 4-bromobenzoilurea dibanding aktivitas analgesik asetosal pada mencit putih (*Mus musculus*) dengan metode *writhing test*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Memperoleh senyawa turunan benzoilurea secara reaksi asilasi Schotten-Baumann termodifikasi yang mempunyai aktivitas sebagai analgesik.

1.3.2 Tujuan Khusus

- Membuktikan adanya aktivitas analgesik senyawa 4-bromobenzoilurea pada mencit putih (*Mus musculus*) dengan metode *writhing test*.

2. Membandingkan aktivitas analgesik senyawa 4-bromobenzoilurea dengan aktivitas analgesik senyawa induk benzoilurea pada mencit putih (*Mus musculus*) dengan metode *writhing test*.
3. Membandingkan aktivitas analgesik senyawa 4-bromobenzoilurea dengan aktivitas analgesik asetosal pada mencit putih (*Mus musculus*) dengan metode *writhing test*.

1.4 Manfaat Penelitian

Dari hasil penelitian diharapkan diperoleh senyawa turunan benzoilurea yaitu, 4-bromobenzoilurea yang mempunyai aktivitas analgesik lebih besar dibanding senyawa induk benzoilurea dan mengetahui perbandingan aktivitasnya dengan asam asetilsalisilat pada mencit putih (*Mus musculus*) sebagai salah satu jalur untuk pengembangan dalam usaha untuk mendapatkan calon obat baru yang bekerja sebagai analgesik setelah melalui uji preklinik dan klinik.

BAB II

TUNJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Mengenai Nyeri

Nyeri didefinisikan oleh Asosiasi Internasional untuk Studi Nyeri sebagai pengalaman sensorik dan emosional yang tidak menyenangkan terkait dengan potensi kerusakan jaringan atau aktual (Sweetman, 2009). Dalam keadaan normal nyeri adalah hasil dari stimulasi reseptor perifer yang mengirimkan impuls melalui jalur nyeri ke otak.

Reseptor rasa sakit atau nociceptors terdiri dari dua jenis dasar, yaitu reseptor mechanoheat dan nociceptor polimodal. Reseptor mechanoheat memiliki ambang rangsangan yang tinggi dan menanggapi rangsangan berbahaya yang intens atau berpotensi merusak. Reseptor ini terkait dengan perlakuan cepat, serat A δ bermyelin tipis, dan stimulasinya menghasilkan nyeri lokal tajam cepat yang berfungsi untuk mengaktifkan refleks penarikan. Disisi lain, nociceptors polimodal menanggapi rangsangan mekanik, termal, atau kimia. Reseptor ini juga diaktifkan oleh komponen seluler yang dilepaskan setelah kerusakan jaringan. Impuls mereka ditransmisikan perlahan sepanjang serat tipe C tidak bermyelin dan mengakibatkan kusam, nyeri, dan nyeri lokal buruk dengan onset lambat.

Nyeri sering diklasifikasikan sebagai akut atau kronis di alam. Nyeri akut berhubungan dengan trauma atau penyakit dan biasanya memiliki lokasi, karakter, dan waktu tertentu. Hal ini disertai dengan gejala hiperaktif otonom seperti takikardia, hipertensi, berkeringat, dan midriasis. Disisi lain, nyeri kronis biasanya dianggap sebagai nyeri yang berlangsung lebih dari beberapa bulan. Ini mungkin tidak jelas terkait dengan trauma, penyakit atau mungkin kekambuhan setelah cedera awal telah sembuh; lokasi,

karakter, dan waktu nyeri yang lebih jelas daripada dengan nyeri akut. Selanjutnya, adanya penyesuaian sistem saraf otonom, tanda-tanda hiperaktif otonom yang terkait dengan nyeri akut menghilang. Beberapa bentuk dari nyeri dianggap sebagai kronis seperti serangan intermiten nyeri dengan diikuti oleh periode nyeri yang relatif lama. Pasien dengan nyeri kronis dari pengalaman fisik, psikologis, sosial, dan kerusakan fungsional memberikan kontribusi terhadap eksaserbasi nyeri.

Terapi dini dari nyeri sangat penting sebagaimana nyeri yang tidak teratasi dapat memiliki efek psikologi yang mendalam pada pasien, dan nyeri akut yang tidak ditanggulangi dengan baik dapat menjadi nyeri kronik, yang mungkin terbukti menjadi jauh lebih sulit untuk diobati.

2.2 Tinjauan Mengenai Analgesik

Analgetika atau obat penghilang nyeri adalah zat-zat yang mengurangi atau menghalau rasa nyeri tanpa menghilangkan kesadaran (perbedaan dengan anestetika umum) (Tjay dan Rahardja, 2007).

Atas dasar kerja farmakologisnya, analgetika dibagi dalam dua kelompok besar, yakni :

- a. Analgetika perifer (non-narkotik), yang terdiri dari obat-obat yang tidak bersifat narkotik dan tidak bekerja sentral. Analgetika antiradang termasuk kelompok ini.
- b. Analgetika narkotik khusus digunakan untuk menghalau rasa nyeri hebat, seperti pada fraktur dan kanker (Tjay dan Rahardja, 2007).

2.2.1 Tinjauan Mengenai Analgesik Perifer

Secara kimiawi analgetika perifer dapat dibagi dalam beberapa kelompok, antara lain :

- a. derivat para-aminofenol : parasetamol
- b. derivat salisilat : asetosal, salisilamida, dan benorilat
- c. derivat asam propionat : ibuprofen, naproksen, ketoprofen, dll
- d. derivat-antranilat : mefenaminat, glafenin
- e. derivat-pirazolon : propifenazon, isopropilaminofenazon, dan metamizol
- f. lain-lain : benzidamin (Tjay dan Rahardja, 2007).

Parasetamol dan obat golongan anti-inflamasi non-steroid adalah analgesik pilihan pertama untuk mengatasi nyeri ringan sampai sedang, juga digunakan pada nyeri sedang sampai berat untuk mempotensiasi efek opioid (Sweetman, 2009). Parasetamol merupakan senyawa turunan *p*-aminofenol, bekerja menghambat prostaglandin secara lemah pada reseptor siklooksigenase (COX) yaitu COX-1, bersifat selektif terhadap COX-2 pada jaringan sentral dan memiliki efek perifer yang sangat kecil (Furst and Ulrich, 2007). Metabolit toksik parasetamol yaitu N-asetil-p-benzoquinoneimie (NAPQI) bersifat reaktif dapat berikatan dengan sel jaringan hati secara *irreversible*. Penggunaan parasetamol dalam dosis besar dan jangka waktu yang lama dapat menimbulkan kerusakan hati (hepatotoksik) (Burke *et al*, 2006).

2.2.2 Tinjauan Mengenai Analgesik Opioid

Analgesik narkotik atau yang kini juga disebut opioid juga memiliki beberapa golongan, diantaranya :

- a. morfin dan alkaloid opium
- b. meperidin dan derivat fenilpiperidin
- c. metadon dan propoksifen

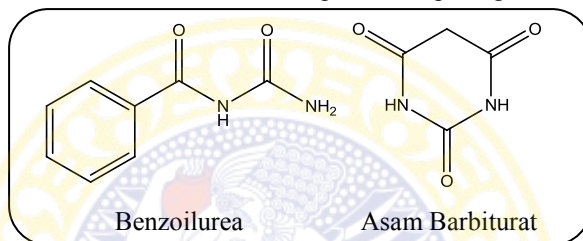
Alkaloid opioid seperti morfin memiliki efek analgesik melalui aksi pada reseptor dalam sistem saraf pusat yang mana merespon terhadap peptida endogen tertentu dengan sifat farmakologi *opioid-like* (Katzung, 2012). Opioid yang poten seperti morfin digunakan untuk nyeri akut berat hingga nyeri kronik, termasuk nyeri pada kanker (Sweetman, 2009). Dengan dosis terapeutik morfin atau penggantinya yang berulang kali diberikan, secara bertahap ada efektivitas yang hilang atau disebut toleransi. Bersamaan dengan toleransi, timbul ketergantungan fisik (Katzung, 2012).

2.2.3 Tinjauan Mengenai Asetosal

Asetosal adalah obat golongan anti-inflamasi non-steroid salisilat yang memiliki banyak kesamaan sifat dengan anti-inflamasi non-steroid non-asetosal. Asetosal dan salisilat lain memiliki sifat analgesik, anti-inflamasi, dan sifat antipiretik mereka bertindak sebagai inhibitor enzim siklooksigenase, yang menghasilkan penghambatan langsung biosintesis prostaglandin dan tromboksan dari asam arakidonat. Asetosal juga menghambat agregasi platelet; sedangkan non-asetat salisilat tidak. Asetosal digunakan untuk menghilangkan ringan sampai nyeri sedang seperti sakit kepala, dismenorea, mialgia, dan rasa sakit pada gigi. Asetosal juga telah digunakan dalam pengelolaan rasa sakit dan peradangan pada rematik akut dan kronis gangguan seperti rheumatoid arthritis, juvenile idiopathic arthritis, osteoarthritis, dan ankylosing spondylitis. Dalam pengobatan kondisi demam ringan, seperti pilek atau influenza, asetosal dapat mengurangi suhu dan meredakan sakit kepala serta nyeri sendi dan otot (Sweetman, 2009).

2.3 Tinjauan Mengenai Benzoilurea dan Turunannya

Aktivitas sebagai penekan susunan saraf dari senyawa aktif benzoilurea dikarenakan adanya gugus farmakoforik yang dimiliki oleh senyawa bahan aktif yaitu adanya gugus ureida asiklik, yang ternyata gugus tersebut juga dimiliki oleh senyawa obat golongan penekan susunan saraf pusat yaitu asam barbiturat (Purwanto, 2013). Perbandingan struktur kimia senyawa benzoilurea dan asam barbiturat dapat dilihat pada gambar 2.1.



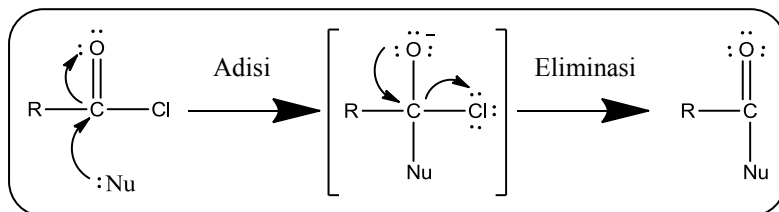
Gambar 2.1 Perbandingan struktur Benzoilurea dan asam barbiturat

Dari hasil uji aktivitas Siswandono, 1999, dapat direkomendasikan bahwa senyawa-senyawa urea seperti; 3,4-diklorobenzoilurea; 4-bromobenzoilurea; 4-n-butilbenzoil urea; 3-trifluorometilbenzoilurea; dan 4-t-butilbenzoilurea, mempunyai prospek untuk dijadikan calon obat karena menunjukkan efek pada sistem saraf pusat yang cukup tinggi, sehingga perlu penelitian lebih lanjut untuk diuji toksisitas akut dan kronis, serta uji farmakologis lanjut untuk menentukan apakah efek tersebut berupa efek relaksan pusat, antikejang, atau efek tranquilizer atau efek lainnya.

2.4 Tinjauan Mengenai Reaksi Asilasi

Reaksi asilasi merupakan proses substitusi gugus asil dari suatu senyawa ke senyawa lain. Zat pengasilasi bertindak sebagai elektrofil dan

biasanya yang diserang adalah atom karbon pada gugus karbonil. Dijelaskan pada mekanisme reaksi 2 tahap seperti pada gambar 2.2.



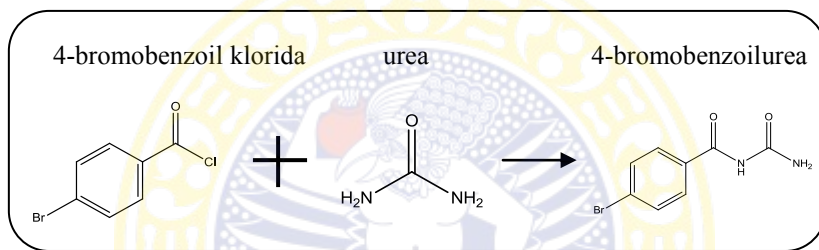
Gambar 2.2 Mekanisme reaksi asilasi

Pada reaksi tahap pertama terjadi penyerangan pada atom karbon di gugus karbonil sehingga terbentuk hasil antara tetrahedral, lalu pada tahap kedua terjadi penataan kembali elektron-elektron dengan diikuti pengusiran gugus pergi yang tergantung pada kebiasaan gugus dimana basa yang lemah merupakan gugus pergi yang baik.

Untuk membuat turunan urea yang merupakan senyawa karbamida diperlukan metode terpilih yaitu reaksi Schotten-Baumann yang merupakan reaksi pembentukan senyawa karbamida secara satu tahap (McMurry, 2015). Reaksi Schotten-Baumann dilakukan dalam suasana basa dan bila semua pereaksi terlarut dalam pelarut yang digunakan. Siswandono, 1999, telah menggunakan reaksi asilasi termodifikasi dalam mereaksikan senyawa urea dengan senyawa turunan benzoilklorida sehingga diperoleh senyawa baru turunan benzoilurea. Modifikasi reaksi asiliasi yang dilakukan pada penelitian ini adalah dengan penambahan basa trietilamin ditujukan untuk menetralkan adanya HCL yang terbentuk dalam hasil samping reaksi.

2.5 Tinjauan Mengenai Sintesis Senyawa 4-bromobenzoilurea

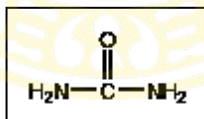
Rancangan sintesis 4-bromobenzoilurea menggunakan reaksi asilasi gabungan metode pencampuran fisik dan reaksi Schotten-Baumann. Disintesis dengan mereaksikan urea dan 4-bromobenzoil klorida dengan pelarut tetrahidrofuran dan penambahan basa trietilamin untuk mengikat HCL yang terbentuk selama reaksi berlangsung. Pada gambar 2.3 berikut ini merupakan rancangan sintesis yang akan dilakukan untuk sintesis senyawa 4-bromobenzoilurea.



Gambar 2.3 Rancangan sintesis senyawa 4-bromobenzoilurea

2.6 Tinjauan Mengenai Bahan Sintesis

2.6.1 Urea

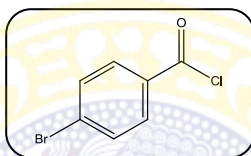


Gambar 2.4 Struktur kimia senyawa urea

Urea memiliki rumus molekul $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ dan struktur kimia yang dapat dilihat pada gambar 2.4 dengan berat molekul 60,06 memiliki titik lebur $132,7^\circ\text{C}$. Urea atau bisa disebut karbamida berupa padatan kristal berprisma, atau bubuk kristalin putih atau pelet, tidak berwarna atau putih,

dan tidak berbau. Urea dapat mengembangkan sedikit bau amonia. Urea memiliki kelarutan dalam air 1:1,5; dalam alkohol 1:10; dalam alkohol mendidih 1:1; dan praktis tidak larut dalam kloroform dan eter. Larutan urea netral terhadap lakmus. Urea disimpan pada suhu kamar 25°C, atau 15°-30°C (Sweetman, 2009).

2.6.2 4-Bromobenzoil klorida



Gambar 2.5 Struktur senyawa 4-bromobenzoil klorida

4-bromobenzoil klorida dengan rumus kimia C_7H_4BrClO dan struktur kimia seperti pada gambar 2.5, memiliki berat molekul sebesar 219,46 gram/mol; dapat disimpan pada suhu 2-8°C. 4-Bromobenzoil klorida berbentuk kristal, bubuk kristalin atau padatan berwarna putih hingga kuning (Sigma-Aldrich).

2.7 Tinjauan Mengenai Analisis Kemurnian Senyawa

2.7.1 Organoleptis

Pemeriksaan dilakukan secara visual dengan tujuan mengetahui bentuk fisik dari senyawa hasil sintesis yang meliputi bentuk, warna, bau, dan rasa.

2.7.2 Jarak lebur

Jarak lebur suatu padatan merupakan suhu dari dimulainya padatan menjadi cairan hingga padatan mencair atau melebur seluruhnya pada

tekanan 1 atmosfer. Jarak lebur merupakan suatu tetapan fisika yang dapat digunakan untuk mengetahui kemurnian suatu senyawa yang berbetuk padatan. Umumnya senyawa murni memiliki jarak lebur yang tajam dengan rentang tidak lebih dari 0,5-1,0 °C. Ketajaman titik lebur dipengaruhi oleh beberapa hal antara lain ukuran kristal, kecepatan pemanasan dan adanya pengotor lain (Vogel, 1986). Bila rentang jarak lebur senyawa hasil sintesis sebesar 2 °C menunjukkan senyawa hasil sintesis cukup murni (Pavia, 2009).

2.7.3 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi adalah suatu metode pemisahan komponen-komponen yang didasarkan pada migrasi senyawa-senyawa pada fase diam dengan pengaruh fase gerak. Pemisahan komponen campuran senyawa kimia dengan kromatografi lapis tipis didasarkan pada perbedaan laju migrasi masing-masing molekul senyawa diantara fase diam dan fase gerak yang dipengaruhi berbagai faktor seperti adsorpsi pada fase diam, kelarutan dalam pelarut, serta perbedaan polaritas antara senyawa dan fase gerak. Kromatografi lapis tipis digunakan untuk analisis kualitatif dengan membandingkan *Retardation factor* (Rf) senyawa dan Rf senyawa pembanding atau standar pada kondisi kromatografi yang sama (plate yang sama). Harga Rf dapat diperoleh dari :

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh noda}}{\text{Jarak yang ditempuh eluen}}$$

Banyak keuntungan penggunaan metode kromatografi lapis tipis dibanding metode lain, antara lain bahan yang dibutuhkan relatif lebih sedikit, prosedurnya mudah dilakukan, dapat dilakukan pengamatan pada beberapa sampel sekaligus pada lempeng yang sama dalam sekali elusi serta biayanya murah (Mulya dan Suharman, 1995).

2.8 Tinjauan Mengenai Konfirmasi Struktur Senyawa

2.8.1 Konfirmasi Struktur Dengan Spektrofotometer UV-Vis

Identifikasi kualitatif dengan melihat intensitas dan panjang gelombang maksimum dari spektrum senyawa yang terbentuk. Intensitas dan panjang gelombang maksimum tergantung dari struktur molekul senyawa elektronik dari gugus-gugusnya. Diperlukan adanya gugus kromofor agar dapat menyebabkan terjadinya penyerapan cahaya pada daerah ultraviolet dan sinar tampak serta gugus auksokrom untuk mengubah intensitas serapan dan panjang gelombang maksimum. Contoh gugus-gugus kromofor adalah C-O, -C-N, -C-S, C-Cl, C=C, sedangkan untuk gugus-gugus auksokrom adalah -OH, -NH₂, -OR, -X (Mulya dan Suharman, 1995).

Senyawa yang dapat dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis adalah senyawa-senyawa yang memiliki gugus-gugus kromofor dan auksokrom. Gugus kromofor merupakan gugus tak jenuh yang dapat mengalami transisi $\pi \rightarrow \pi^*$ dan $n \rightarrow \pi^*$ sedangkan gugus auksokrom merupakan gugus yang tidak dapat mengalami transisi $\pi \rightarrow \pi^*$ tapi dapat mengalami transisi elektron.

2.8.2 Konfirmasi Struktur Dengan Spektrofotometer Inframerah

Dengan melihat intensitas dan bilangan gelombang pita serapan dari spektrum yang terbentuk oleh transisi antara tingkat energi getaran yang berbeda, dapat mengidentifikasi struktur dan gugus-gugus fungsi yang terdapat pada suatu senyawa yang di uji (Mulya dan Suharman, 1995).

Identifikasi gugus-gugus fungsi dapat dilakukan pada daerah khusus yakni daerah antara 1400-4000 cm⁻¹ yang berada pada bagian kiri spektrum inframerah. Bagian spektrum yang biasa digunakan untuk identifikas

gugus-gugus fungsi ini dapat disebut daerah sidik jadi yang mana setiap gugus fungsi memiliki serapan yang unik pada daerah ini.

Setiap gugus memiliki karakteristik absorpsi tertentu, sebagai contoh senyawa aromatis menunjukkan adanya getaran ulur C-H pada bilangan gelombang 3030cm^{-1} , getaran ulur C-C pada bilangan gelombang $1500-1450\text{cm}^{-1}$ dan getaran ulur C=C pada bilangan gelombang $1600-1500\text{cm}^{-1}$. Adanya pita yang tampak kuat pada daerah sekitar 1650 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus karbonil. Pada gugus hidroksil fenol adanya O-H ditandai dengan adanya serapan yang kuat di daerah $3650-3548\text{ cm}^{-1}$.

Amina menunjukkan absorpsi uluran NH yang jelas pada sekitar $3000-3700\text{ cm}^{-1}$ dikiri absorpsi C-H, bila terdapat dua hidrogen pada suatu nitrogen amida ($-\text{NH}_2$) maka absorpsi NH akan nampak sebagai peak kembar. Absorpsi oleh C=C aromatis akan nampak pada sekitar $1400-1500\text{ cm}^{-1}$ sedangkan gugus karbonil akan memberikan absorpsi di daerah $1600-1725\text{ cm}^{-1}$ (Pavia *et al*, 2009)

2.9 Tinjauan Mengenai Uji Aktivitas Analgesik

Metode-metode pengujian aktivitas analgesik bertujuan untuk menentukan secara reproduibel suatu zat uji terhadap ambang nyeri dengan mengukur respon refleksnya terhadap rangsangan syok panas, tekanan, listrik dan kimia. Induksi nyeri meliputi mekanik, elektrik dan kimia. Pada umumnya daya kerja analgesik pada hewan dinilai dengan :

1. Mengukur besarnya peningkatan stimulus nyeri yang haru diberikan sampai ada respon nyeri.
2. Jangka waktu ketahanan hewan terhadap stimulus nyeri.
3. Besarnya frekuensi respon nyeri. (Domer, 1971)

2.9.1 Metode Stimulasi Panas

Penggunaan stimulasi rangsangan panas pada metode ini diberikan secara radiasi dengan intensitas tetap, dikenal dengan metode *tail flick* oleh D'amour-Smith. Sumber panas yang dikeluarkan secara radiasi berasal dari tegangan 6-8 volt dilengkapi dengan satu refraktor untuk memfokuskan panas lampu melalui suatu lensa menuju ujung ekor tikus yang terletak 6 inci di bawah lampu. Kelemahan metode *tail flick* yakni sangat melelahkan mata.

Mirip dengan metode sebelumnya, penggunaan lampu dengan daya 100 watt digunakan dalam metode yang digunakan oleh Bass dan Van Der Brook. Hanya saja pada metode ini dilakukan perekaman secara otomatis selama penyinaran pada pencatat waktu dan memudahkan pengamatan respon hewan dengan pemakaian *stop watch*.

Selain kedua metode di atas, panas dapat pula diberikan secara konduksi dikenal dengan metode *Hot Plate* oleh Wolf dan Mc Donald. Hewan coba yang berupa mencit menunjukkan respon seperti menjilat kaki, mengangkat kaki, menendang kaki atau meloncat. Mencit diamati waktu untuk menimbulkan reaksi tersebut setelah diletakkan di atas *hot plate* yang memiliki suhu tertentu. Pada suhu 50°C hewan coba memberikan reaksi yang tak teratur, namun pada suhu 55°C waktu reaksinya 30 detik sedangkan pada suhu 60°C waktu reaksinya 20 detik. (Domer, 1971)

Keuntungan dari metode stimulasi panas adalah rangsangannya alami, mudah dikontrol, tidak menyebabkan kerusakan jaringan walaupun rangsangan untuk menimbulkan rasa sakit dilakukan berkali-kali, dan dapat digunakan pada subyek yang bergerak ataupun tidak bergerak (Domer, 1971)

2.9.2 Metode Stimulasi Listrik

Kera (*Macaca mulata*) digunakan untuk melaksanakan metode ini yang mana elektrode aliran listrik akan dipasang di *ganglion gaseri* atau telinga. Sebenarnya, stimulasi listrik dapat dilakukan dengan beberapa cara seperti melalui jaringan listrik pada lantai, dengan elektrode yang ditempelkan pada kulit, dan elektrode yang ditanam pada ganglia sensoris atau pada tempat susunan saraf pusat. Hewan coba tadi diberikan arus tertentu dan bila merasa kesakitan maka arus diturunkan satu tingkat secara otomatis sehingga dapat diukur ambang rasa sakitnya.

Setelah adanya perlakuan terhadap hewan coba, percobaan diulang kembali, jika ambang rasa sakitnya meningkat maka dapat disimpulkan bahwa senyawa pada perlakuan yang diberikan pada hewan coba memiliki efek analgesik. Kekurangan dari metode ini yaitu memerlukan perlengkapan khusus dan rumit. Metode lain yang dapat digunakan selain metode di atas adalah metode pulpa gigi namun sulit dilakukan karena membutuhkan keterampilan yang tinggi (Domer, 1971).

Adanya keuntungan metode stimulasi listrik adalah stimulan dapat dikontrol menggunakan stimulator arus listrik yang dipertahankan konstan walaupun terjadi fluktuasi daya tahan subyek, dapat digunakan dan diukur dengan mudah, dapat menghasilkan rasa sakit yang hebat tanpa merusak jaringan, dapat diulang dengan interval yang sangat pendek, *onsetnya* cepat, dan dapat digunakan pada segala macam spesies. (Domer, 1971)

2.9.3 Metode Stimulasi Tekanan

Pengujian aktivitas analgesik dilakukan dengan menggunakan tekanan yang diberikan melalui suatu alat syringe dari suatu rangkaian tertutup terdiri atas suatu minyak mineral yang dihubungkan dengan pipa-T

dengan syringe lain pada ekor tikus. Biasanya tekanan akan menyebabkan tikus meronta-ronta untuk melepaskan diri atau mencicit. Hasil dari percobaan ini bersifat kualitatif dan kekurangan metode ini yaitu ekor mencit menjadi cedera setelah percobaan sehingga tidak dapat diulang karena dapat mempengaruhi percobaan selanjutnya.

Disisi lain, keuntungan dari metode ini adalah rangsangannya alami, mudah digunakan tanpa adanya peralatan mekanik atau elektronik yang mahal, namun terdapat kendala bahwa kontrol dan ukuran parameter stimulus yang baik sulit didapatkan tanpa adanya peralatan mekanik dan elektronik yang canggih. Selain itu, metode ini hanya digunakan pada hewan coba yang tidak bergerak (sudah dibius) karena pada hewan yang bergerak akan menyulitkan kontrol dan pengukuran. (Domer, 1971)

2.9.4 Metode Stimulasi Kimiawi

Hewan kecil seperti mencit (*Mus musculus*) digunakan pada metode ini dengan diberikan rasa nyeri. Nyeri diinduksi dengan injeksi iritan kedalam rongga peritoneal mencit. Hewan tersebut bereaksi dengan perilaku peregangan yang disebut geliatan, selanjutnya dikenal dengan metode *writhing test*. Uji coba ini cocok untuk mendeteksi aktivitas analgesik walaupun beberapa agen psikoaktif juga menunjukkan aktivitas (Vogel, 2008). Suatu agen pengiritasi seperti fenilquinon, asam asetat, baridikinin atau asetilkolin diinjeksikan secara intra peritoneal pada mencit lalu reaksi geliatan dari mencit dievaluasi (Domer, 1971). Metode uji aktivitas analgesik ini lebih disukai karena memberikan hubungan bertingkat antara intensitas rangsangan nyeri dan dosis senyawa yang dibutuhkan untuk menahan rangsangan nyeri sehingga dapat diperoleh estimasi kuantitas aktivitas analgesik suatu senyawa (Turner, 1965).

Pengamatan frekuensi geliat pada kelompok hewan yang diberikan senyawa uji dibandingkan dengan frekuensi geliat pada masing-masing kelompok yang diberikan standar (obat yang sudah teruji efek analgesiknya) dan plasebo (kontrol). Adanya penurunan frekuensi geliat karena suatu senyawa yang memiliki efek analgesik menggambarkan kemampuan senyawa tersebut dalam meningkatkan ambang rasa nyeri (Dyah dkk, 2002).

2.10 Tinjauan Mengenai *ANOVA*

Analysis of variance atau *ANOVA* merupakan salah satu uji parametrik yang berfungsi untuk membedakan nilai rata-rata lebih dari dua kelompok data dengan cara membandingkan variansinya. Prinsip uji *Anova* adalah melakukan analisis variabilitas data menjadi dua sumber variasi yaitu variasi di dalam kelompok (*within*) dan variasi antar kelompok (*between*). Bila variasi *within* dan *between* sama (nilai perbandingan kedua varian mendekati angka satu), berarti nilai mean yang dibandingkan tidak ada perbedaan. Sebaliknya bila variasi antar kelompok lebih besar dari variasi didalam kelompok, nilai mean yang dibandingkan menunjukkan adanya perbedaan.

Uji *Anova* dapat dibagi menjadi 2 jenis berdasarkan jumlah variabel yang diamati, yaitu *One Way Anova* dan *Two Way Anova*. *One Way Anova* digunakan bila ada satu variabel yang ingin diamati, sedangkan *Two Way Anova* digunakan apabila terdapat dua variabel yang ingin diamati. Uji *Anova* dapat digunakan untuk menyelidiki apakah ada pengaruh perlakuan terhadap respon penelitian. Uji-uji yang dapat digunakan antara lain uji masingmasing perlakuan dan uji interaksi antar pelakuan.

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 Kerangka Konseptual

Nyeri merupakan penyakit yang umum dirasakan oleh manusia. Nyeri dapat diklasifikasikan menjadi dua yaitu nyeri akut dan nyeri kronis. Nyeri akut masih bisa ditanggulangi dengan analgesik perifer, namun pada nyeri kronis biasanya digunakan analgesik opioid yang memiliki efek sentral. Namun seperti diketahui analgesik perifer seperti parasetamol memiliki efek samping yang cukup berat yaitu hepatotoksik dan analgesik opioid seperti morfin juga memiliki efek samping yaitu ketergantungan serta toleransi.

Penemuan obat baru bertujuan untuk pengobatan suatu jenis penyakit tertentu, meningkatkan aktivitas obat, menurunkan efek samping yang merugikan atau toksisitas, dan meningkatkan selektivitas obat. Diteliti oleh Suzana dkk, 2004, adanya efek CNS depresan pada senyawa benzoiltiourea, kemudian dilanjutkan dengan penelitian uji aktivitas analgesik senyawa tersebut dan terbukti adanya aktivitas analgesik pada senyawa benzoiltiourea (Budiati dkk, 2010).

Adanya kemiripan struktur kimia antara senyawa benzoiltiourea dan benzoilurea, mengindikasikan adanya aktivitas analgesik pada senyawa benzoilurea sehingga mendorong untuk dilakukan penelitian uji aktivitas analgesik terhadap turunan senyawa tersebut. Turunan senyawa benzoilurea yang akan disintesis dan diuji aktivitas analgesik nya adalah 4-bromobenzoilurea memiliki harga ClogP sebesar 2,079; CMR sebesar 5,202 dan σ_{Br} sebesar 0,23 serta *Rerank Score* -68,275. Data tersebut mendukung prediksi bahwa senyawa 4-bromobenzoilurea memiliki aktivitas analgesik

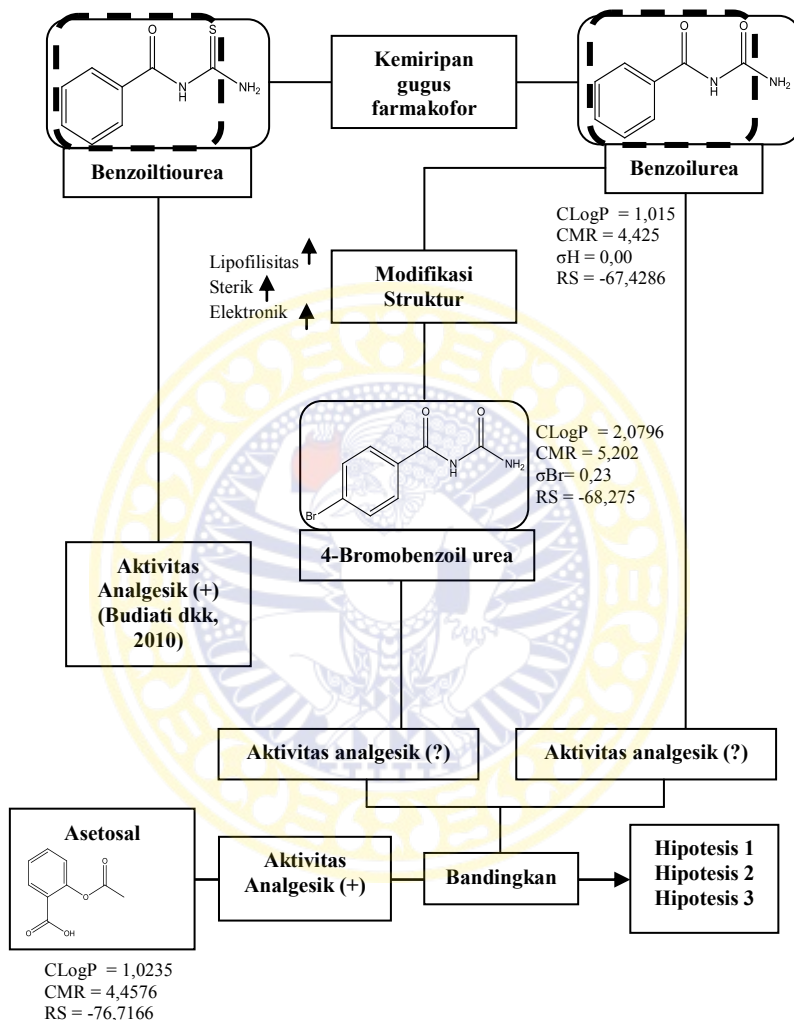
lebih kuat dibanding senyawa induk benzoilurea, mendekati aktivitas asetosal sehingga layak untuk disintesis.

Untuk sintesis senyawa turunan benzoilurea digunakan reaksi asilasi dengan modifikasi penambahan basa trietilamin, sebenarnya sintesis senyawa 4-bromobenzoilurea sudah berhasil dilakukan oleh Siswandono, 1999, dengan reaksi asilasi termodifikasi menggunakan pelarut tetrahidrofurana tanpa penambahan basa. Namun, pada penelitian ini diberikan modifikasi penambahan basa trietilamin yang dapat menetralkan HCl selama reaksi berlangsung.

Hasil sintesis senyawa akan diuji organoleptis, kemurnian jarak lebur dan kromatografi serta dikonfirmasi strukturnya dengan spektrofotometer UV-Vis, dan FT-IR. Hasil sintesis juga akan diuji aktivitas analgesiknya dengan metode writhing test dengan 3 tingkat dosis pada mencit putih (*Mus musculus*) serta pembandingan senyawa induk benzoilurea dan asetosal untuk perbandingan aktivitas analgesiknya. Data hasil uji aktivitas ketiga senyawa dinyatakan dengan ED_{50} .

3.2 Skema Kerangka Konseptual

Berdasarkan kerangka konseptual diatas maka dapat digambarkan alur pemikiran untuk tujuan penelitian seperti yang terlihat pada gambar 3.1.

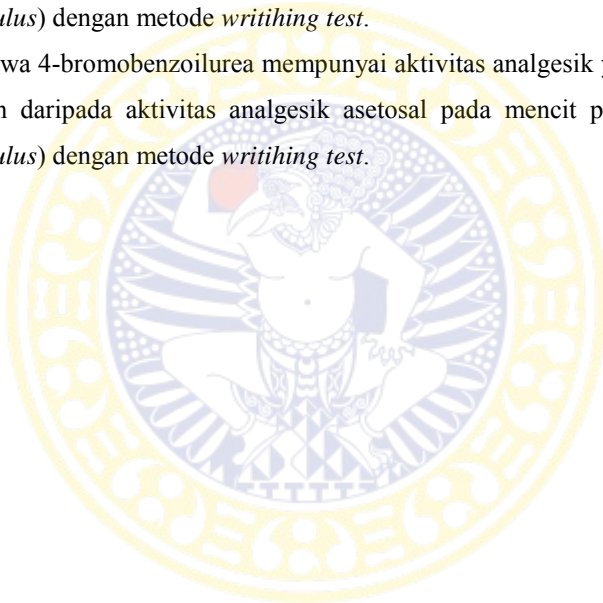


Gambar 3.1 Skema kerangka konseptual

3.3 Hipotesis Penelitian

Dari kerangka konseptual penelitian di atas dibuat hipotesis-hipotesis sebagai berikut:

1. Senyawa 4-bromobenzoilurea mempunyai aktivitas sebagai analgesik pada mencit putih (*Mus Musculus*) dengan metode *writihing test*.
2. Senyawa 4-bromobenzoilurea mempunyai aktivitas analgesik yang lebih besar dibanding senyawa induk benzoilurea pada mencit putih (*Mus Musculus*) dengan metode *writihing test*.
3. Senyawa 4-bromobenzoilurea mempunyai aktivitas analgesik yang lebih rendah daripada aktivitas analgesik asetosal pada mencit putih (*Mus Musculus*) dengan metode *writihing test*.



BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Uji aktivitas senyawa 4-bromobenzoilurea yang diperoleh dari satu kali sintesis melalui reaksi asilasi senyawa urea dengan 4-bromobenzoil klorida. Penelitian ini merupakan eksperimental laboratorik.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

4.2.1 Tempat Penelitian

Laboratorium Kimia Medisinal, Maxmal Multiguna I, Maxmal Multipurpose II, serta hewan coba Departemen Farmakognosi dan Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

4.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan dari bulan April sampai Agustus 2016.

4.3 Bahan Penelitian

4.3.1 Bahan Kimia

- Urea (Sigma)
- 4-bromobenzoil klorida. (Sigma)
- Natrium bikarbonat p.a. (Sigma)
- Tetrahidrofuran p.a. (E. Merck)
- Etanol p.a. (E. Merck)
- Trietilamin pro sintesis. (Sigma)
- Kloroform p.a. (E. Merck)
- Aseton p.a. (E. Merck)

- Etil asetat p.a. (E. Merck)
- Etanol p.a. (E. Merck)
- Asam asetat glasial (Sigma),
- CMC-Na (Sigma),
- Aquadest.
- Benzoilurea,
- Asetosal.

4.3.2 Hewan Percobaan

Pada uji aktivitas analgesik digunakan hewan coba mencit putih *Mus musculus* galur balb C yang diperoleh dari Pusat Veteriner Farma (PUSVETMA), dengan karakteristik jantan, dewasa berumur 2-3 bulan, sehat, tak ada kelainan yang tampak pada bagian tubuhnya, dengan berat badan antara 20-30 g (Rahman et al, 2001). Sebelum diberi perlakuan, mencit diadaptasikan terhadap lingkungannya selama 1-2 minggu. Sebelum percobaan mencit dipuasakan selama 12 jam, tiap mencit hanya di gunakan sekali perlakuan. Jumlah mencit dibagi menjadi 10 kelompok, 9 kelompok untuk sampel, kontrol positif 1 (benzoilurea), dan kontrol positif 2 (asetosal), serta 1 kelompok untuk kontrol negatif (plasebo). Masing-masing kelompok terdapat 6 ekor mencit sesuai dengan rumus Frederer $(n-1) (t-1) \geq 15$ dengan n jumlah hewan yang diperlukan dan t jumlah kelompok perlakuan.

4.4 Instrumen Penelitian

Alat gelas umum yang biasa digunakan di laboratorium diperlukan untuk penelitian termasuk neraca analitik, peralatan untuk sintesis, peralatan untuk kromatografi lapis tipis termasuk *plate* dan bejana, serta alat penunjang lain seperti UV-*lamp* 254 nm untuk melihat noda senyawa pada

KLT. Selain itu juga digunakan *Melting Point Apparatus* (Fischer-Johns) untuk penentuan titik lebur senyawa hasil sintesis.

Peralatan fisikokimia yang digunakan untuk konfirmasi struktur adalah:

- a. Spektrofotometer Dual-Wavelength UV-Vis Perkin Elmer Lambda EZ 201
- b. Spektrometer Fourier Transform Inframerah (FT-IR), Jasco FT/IR

Untuk uji aktivitas analgesik peralatan yang digunakan antara lain adalah:

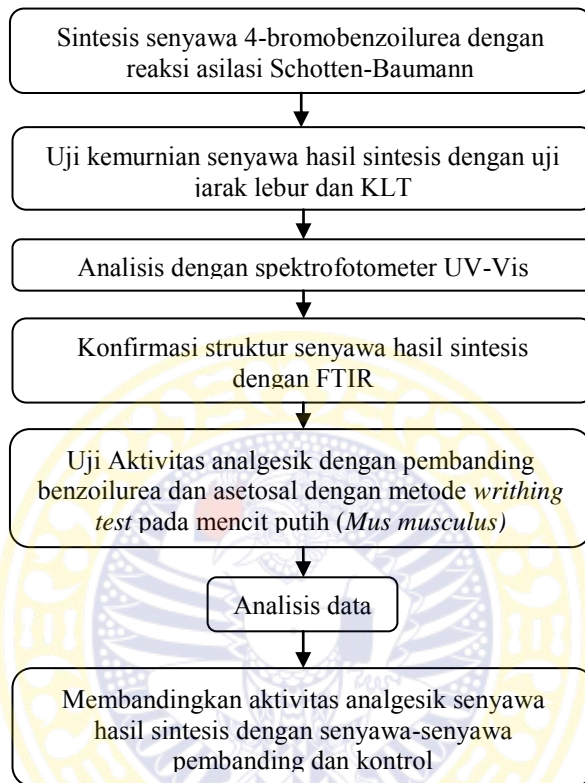
- a. Kamera atau *handphone*
- b. *Stop Watch*
- c. *Spuir disposable* 1ml (Terumo)
- d. Timbangan mencit (Ohaus)

Untuk analisis data, studi *in silico* dan sebagainya digunakan komputer beserta kelengkapannya dan program-program software antara lain:

- a. Molegro virtual Docker 5
- b. ChemBioDraw Ultra ver. 12.0
- c. ChemBio3D Ultra ver. 12.0
- d. SPSS ver. 13.0

4.5 Metode Penelitian

Skema untuk metode penelitian dapat digambarkan dengan kerangka operaional seperti yang tertera pada gambar 4.1.



Gambar 4.1 Kerangka operasional

4.6 Sintesis Senyawa Turunan Benzoilurea: 4-bromobenzoilurea

4.6.1 Prosedur Sintesis

Pada labu alas bulat 200 ml, 1,5 g (0,025 mol) urea dicampur dengan 30 ml tetrahidrofuran yang ditambahkan basa trietilamin 3,5 ml (0,025 mol). Pada suhu kamar ditambahkan larutan 4-bromobenzoilklorida 2,74 g (0,0125 mol) dalam 15 ml tetrahidrofuran dalam corong pisah, teteskan sedikit demi sedikit, sambil diaduk-aduk. Campuran direfluks di atas

penangas air hingga benzoilklorida habis (cek KLT tiap jam).. Hasil reaksi berupa zat padat amorf warna putih, kemudian dituang ke dalam aquadest 100 ml dan tambahkan larutan natrium bikarbonat jenuh sambil di aduk-aduk sehingga tidak keluar buih lagi. Residu disaring dengan corong Buchner, dicuci dengan 50 ml air 2 kali (Siswandono, 1999).

4.6.2 Rekristalisasi

Padatan (Residu) dipindahkan ke beker glass, ditambahkan etanol secukupnya. Beaker glass diletakkan di atas pengaduk magnit dengan pemanas (suhu diatur 70-80° C) sambil diaduk perlahan-lahan, ditambahkan pelarut lagi sedikit demi sedikit sampai tepat larut. Disaring dalam keadaan panas, filtrat dibiarkan dalam suhu kamar sampai dingin dan didiamkan semalam. Kristal yang terbentuk disaring dengan corong Buchner, dibilas dengan etanol dingin 2 kali @ 10 ml. Kristal dipindahkan ke cawan petri yang sudah diketahui beratnya, dikeringkan di oven pada suhu tetap 50°C, kemudian ditimbang untuk menghitung persentase hasil (Siswandono, 1999).

4.7 Uji Kemurnian Senyawa Hasil Sintesis

4.7.1 Pemeriksaan Organoleptis Senyawa Hasil Sintesis

Pemeriksaan yang dilakukan pada senyawa 4-bromobenzoilurea yang disintesis meliputi bentuk, warna, dan bau.

4.7.2 Analisis Dengan Kromatografi Lapis Tipis

Untuk melihat ada atau tidaknya pengotor dari hasil samping reaksi sintesis, dilakukan analisis dengan metode kromatografi lapis tipis.

pelarut	: etanol
fasa diam	: lempeng kromatografi kiesel gel 60 GF-254.
Fase Gerak 1	: Kloroform : etil asetat = 7 : 3
Fase Gerak 2	: Kloroform : aseton = 7 : 3
Fase Gerak 3	: Kloroform : etil asetat : aseton = 1 : 2 : 1
penampak noda	: lampu UV-254 nm.
pembanding	: 4-bromobenzoil klorida

Bejana untuk KLT diisi dengan eluen, biarkan hingga bejana jenuh. sejumlah zat senyawa hasil sintesis dilarutkan dalam etanol, kemudian ditotolkan pada lempeng KLT yang telah diberi batas atas 0,5 cm dan batas bawah 1,5 cm, lalu dilakukan eluasi hingga tercapai pada batas atas. Jika sudah, angkat lempeng KLT dan dikeringkan, amati noda pada lampu uv 254 dan menentukan harga Rf. Fase gerak tersebut merupakan hasil optimasi dan hasil dari penelitian oleh Siswandono. Digunakan 3 sistem eluen dengan kepolaran yang berbeda agar dapat memastikan bahwa noda yang terbentuk merupakan satu noda. Noda tunggal pada sistem eluen yang berbeda tersebut menunjukkan bahwa senyawa tersebut merupakan senyawa yang murni secara KLT.

4.7.3 Penentuan Jarak Lebur

Untuk melihat kemurnian senyawa hasil sintesis 4-bromobenzoilurea dilakukan penentuan titik lebur menggunakan *Melting Point Apparatus* (Fischer-Johns). Senyawa hasil sintesis dimasukkan ke dalam 3 pipa kapiler yang ujung lainnya sudah tertutup hingga setinggi 3-5mm. Kemudian satu per satu pipa kapiler diletakkan ke dalam luba *Melting Point Apparatus*, mesin dinyalakan, amati suhu ketika senyawa mulai melebur sampai melebur seluruhnya, dilanjutkan dengan pipa kapiler yang lain. Bila rentang

jarak lebur senyawa hasil sintesis sebesar 2 °C menunjukkan senyawa hasil sintesis cukup murni (Pavia, 2009).

4.8 Konfirmasi Struktur Senyawa Hasil Sintesis

4.8.1 Analisis Dengan Spektrofotometer UV-Vis

Senyawa hasil sintesis dilarutkan dalam pelarut etanol p.a. Lalu dilakukan pemeriksaan spektrum menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis dan diukur serapannya pada $\lambda = 200-340$ nm, dan diamati λ maksimumnya.

4.8.2 Analisis Dengan Spektrofotometer Inframerah

Senyawa dibuat dalam pelet KBr dengan 0,5-1,0 mg dicampur dengan 100 mg serbuk kering KBr digerus hingga halus dan homogen kemudian dipress. Dibuat spektrum IR pada $\nu = 500-4000$ cm⁻¹, dan diamati letak/kedudukan puncak pita yang terbentuk oleh gugus-gugus fungsi.

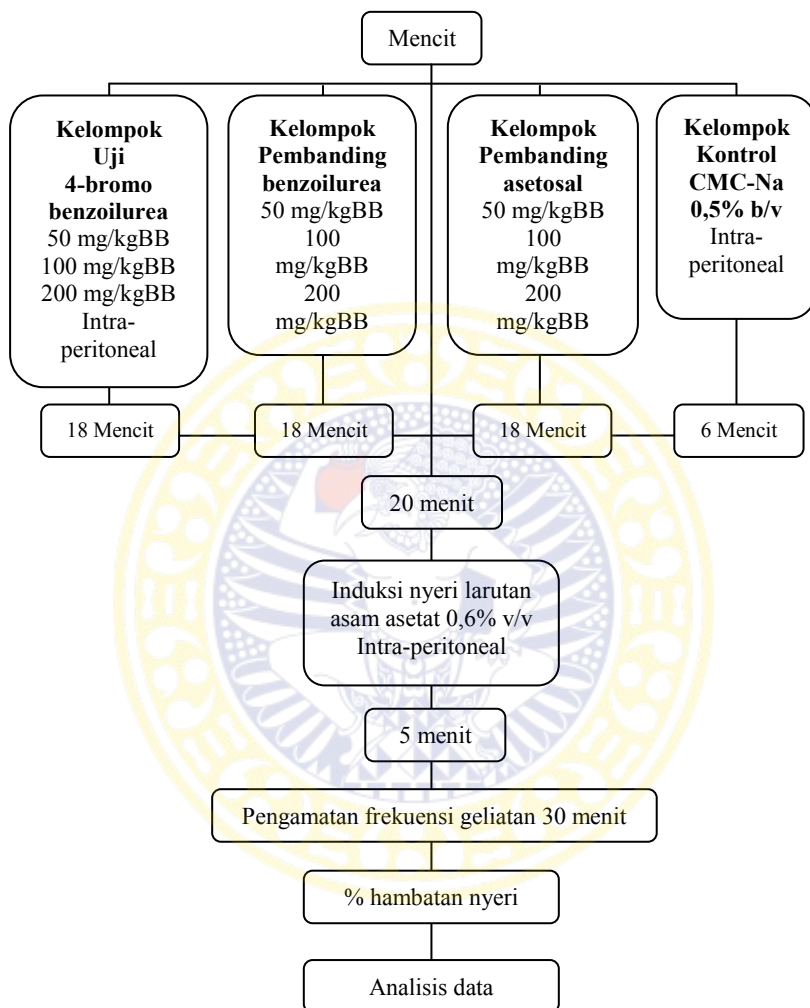
4.9 Uji Aktivitas Analgesik Senyawa 4-bromobenzoilurea

Uji aktivitas analgesik senyawa 4-bromobenzoilurea dilakukan dengan uji menggunakan induksi iritan intra-peritoneal dan menentukan ED₅₀. Sebagai senyawa pembanding digunakan benzoilurea, senyawa induk yang juga memiliki gugus ureida asiklik untuk membuktikan kebenaran studi in silico dan asetosal untuk membandingkan aktivitas analgesiknya. Pada uji aktivitas ini sebagai hewan coba digunakan mencit putih *Mus musculus* galur Blab C, jantan, dewasa, sehat, tak ada kelainan yang tampak pada bagian tubuhnya dengan berat badan antara 20-25 g dan diberi diet yang sama selama lebih kurang dua minggu.

Prosedur:

Mencit dibagi menjadi 10 kelompok, tiap kelompok terdiri dari 6 ekor. 1 untuk kelompok kontrol dan 9 kelompok untuk sampel, benzoilurea dan aseptosal. 9 Kelompok ini pembagian atas kelompok dosis yang diberikan 200, 100, 50 mg/kgBB pada masing-masing senyawa obat dan calon obat. Setiap hewan coba dalam kelompok ditimbang beratnya secara teliti, dan ditandai untuk identifikasi. Dosis senyawa yang akan diinjeksikan ditentukan. Dihitung dosis obat (volume suspensi yang disuntikkan). Senyawa diberikan secara intra-peritoneal pada mencit (Rahman, 2001), 20 menit setelah pemberian, mencit diinduksi dengan injeksi asam asetat 0,6% dengan volume 0,1 ml, biarkan mencit selama 5 menit.

Mencit kemudian diamati selama tiga puluh menit dan jumlah geliatan dicatat atau direkam untuk setiap hewan. Geliatan ditandai dengan sebuah peregang perut dengan simultan peregang setidaknya satu kaki belakang. Frekuensi geliat yang berbeda bermakna ditentukan dengan analisis *one-way ANOVA*. Rumus untuk menghitung persen penghambatan adalah: rata-rata geliatan pada kelompok kontrol dikurangi geliatan dalam kelompok obat dibagi dengan geliatan pada kelompok kontrol kali 100%. Periode waktu dengan persen inhibisi terbesar dianggap sebagai waktu puncak. Perhitungan ED_{50} diperoleh melalui persamaan regresi log dosis vs % hambatan nyeri. Alur kerja untuk uji aktivitas analgesik senyawa pada mencit putih (*Mus musculus*) dapat digambarkan pada gambar 4.2.



Gambar 4.2 Skema prosedur uji aktivitas analgesik *writhing test*

4.9.1 Preparasi Larutan Asam Asetat 0,6 % v/v dan Mucilago Natrium-karboksimetilselulosa 0,5% b/v

Dilakukan pengenceran terhadap 0,6 ml asam asetat glasial dengan aqua ad 100,0 ml; larutan ini digunakan untuk penginduksi nyeri pada mencit. Musilago CMC-Na 0,5% b/v dibuat dengan mendispersikan 500 mg CMC-Na di atas aqua panas sebanyak 20 kali jumlah CMC-Na (± 10 ml) biarkan mengembang ± 5 menit, lalu gerus dan encerkan hingga 100,0 ml; larutan ini digunakan sebagai kontrol. Larutan ini diinjeksikan sebanyak 0,1 ml/g BB secara intra-peritoneal pada masing-masing mencit. (Vogel, 2008)

4.9.2 Preparasi Sediaan Uji

Sediaan uji merupakan 4-bromobenzoilurea, benzoilurea dan asetosal yang masing-masing disuspensikan dengan CMC-Na 0,5% b/v sebanyak 10 ml. Pertama-tama dibuat larutan CMC-Na 0,5% b/v dari pendispersian 500 mg CMC-Na di atas aqua dengan jumlah 20 kali CMC-Na ± 10 ml, biarkan untuk mengembang ± 5 menit. Lalu gerus hingga homogen, pindahkan ke labu ukur, bilas dengan aqua dan tambahkan aqua hingga 100,0 ml. Untuk sediaan uji, direncanakan memiliki konsentrasi 0,5% b/v dalam larutan CMC-Na 0,5% b/v. Dilakukan penimbangan 60 mg senyawa, gerus hingga halus dan campurkan dengan larutan CMC-Na 0,5% b/v hingga terbentuk dispersi padat, lalu pindahkan ke labu ukur, bilas mortir beberapa kali dan tambahkan larutan CMC-Na 0,5% b/v hingga diperoleh volume 5,0 ml; sediaan uji memiliki konsentrasi 12 mg/ml.

4.9.3 Perhitungan Dosis

Untuk senyawa uji dan pembanding digunakan 3 dosis yaitu 200, 100, 50 mg/kg BB Dosis tersebut dipertimbangkan agar mendapatkan %

hambatan nyeri dengan harga di bawah dan di atas 50% agar dapat menentukan harga ED_{50} . Berat mencit yang digunakan adalah 20-30 gram, apabila diasumsikan berat mencit 30 gram, maka perhitungan dosis adalah sebagai berikut:

- 50 mg/kgBB x 0,03 kg = 1,5 mg/mencit
- 100 mg/kgBB x 0,03 kg = 3,0 mg/mencit
- 200 mg/kgBB x 0,03 kg = 6,0 mg/mencit

Diasumsikan sediaan uji memiliki konsentrasi 12 mg/ml maka yang diberikan untuk mencit dengan berat 30 g secara intra-peritoneal adalah sebagai berikut:

- $\frac{1,5 \text{ mg}}{12 \text{ mg per ml}} \times 1 \text{ ml} = 0,125 \text{ ml sediaan uji/mencit BB 30 g}$
- $\frac{3,0 \text{ mg}}{12 \text{ mg per ml}} \times 1 \text{ ml} = 0,25 \text{ ml sediaan uji/mencit BB 30 g}$
- $\frac{6,0 \text{ mg}}{12 \text{ mg per ml}} \times 1 \text{ ml} = 0,5 \text{ ml sediaan uji/mencit BB 30 g}$

4.10 Analisis Data

Data yang didapatkan dari uji aktivitas analgesik pada senyawa hasil sintesis 4-bromobenzoilurea, senyawa pembanding benzoilurea dan asetosal masing-masing dengan tiga dosis berbeda serta kontrol CMC-Na 0,5% kemudian diolah secara statistik dengan bantuan komputer program SPSS (*Statistical Program for the Social Sciences*) 15.0, untuk mengetahui adanya perbedaan kemaknaan dari kelompok-kelompok perlakuan dilakukan uji analisis statistik varians satu arah (*one-way ANOVA*) pada $\alpha = 0,05$ dengan hipotesis H_0 = Tidak ada perbedaan aktivitas analgesik yang bermakna antar kelompok uji, kelompok kontrol dan kelompok

pembandingan; H_a = ada perbedaan aktivitas analgesik yang bermakna antar kelompok uji, kelompok kontrol dan kelompok pembandingan.

Kesimpulan dapat diambil dari harga probabilitas (p) pada $\alpha = 0,05$, bila nilai $p > 0,05$ maka H_0 diterima sedangkan H_a ditolak, begitu pula sebaliknya. Apabila terdapat perbedaan yang bermakna maka uji statistik dilanjutkan dengan uji LSD untuk mengetahui dari masing-masing perlakuan mana yang berbeda bermakna.

Melalui perhitungan data diperoleh harga % hambatan nyeri dari setiap perlakuan dan masing-masing dosis. Persentase hambatan nyeri dari senyawa dapat dihitung dengan rumus % hambatan nyeri = $\frac{f_k - f_u}{f_k} \times 100\%$ dimana F_k adalah rata-rata frekuensi geliat kelompok kontrol, dan f_u adalah rata-rata frekuensi geliat kelompok uji (Vogel, 2008). Dari data % hambatan nyeri dan log dosis dapat dibuat kurva sehingga persamaan regresi linier dapat diperoleh, dari persamaan tersebut akan dapat dihitung besarnya harga ED_{50} (hambatan nyeri = 50%).

BAB V

HASIL PENELITIAN

5.1 Persentase Senyawa Hasil Sintesis

Senyawa 4-bromobenzoilurea hasil sintesis bisa diperoleh melalui reaksi asilasi senyawa urea dengan 4-bromobenzoil klorida. Berat senyawa hasil sintesis adalah sebesar 0,112 gram dan perhitungan persentase hasil diperoleh dari perbandingan antara berat senyawa hasil sintesis dengan berat hasil secara teoritis (3,038 gram) sehingga didapatkan sebesar 3,69%. Cara perhitungan persentase hasil dapat dilihat pada Lampiran 2.

5.2 Analisis Kualitatif Senyawa Hasil Sintesis

5.2.1 Analisis Kualitatif Senyawa Dengan Pemeriksaan Organoleptis

Dilakukan pemeriksaan organoleptis secara visual dengan mengamati bentuk, warna dan bau dari senyawa 4-bromobenzoilurea hasil sintesis. Hasil pemeriksaan organoleptis dari senyawa hasil sintesis tertera pada Tabel V.1.

Tabel V.1
Hasil Pemeriksaan Organoleptis Senyawa Hasil Sintesis

Pemeriksaan	Hasil Pengamatan
Bentuk	Kristal jarum kecil
Warna	Putih
Bau	Tidak berbau

5.2.2 Analisis Kualitatif Dengan Pemeriksaan Jarak Lebur

Dilakukan pemeriksaan jarak lebur terhadap senyawa 4-bromobenzoilurea hasil sintesis dengan menggunakan alat *Melting Point*

Apparatus (Fischer-Johns). Hasil pemeriksaan jarak lebur senyawa hasil sintesis dapat dilihat pada Tabel V.2.

Tabel V.2
Hasil Penentuan Jarak Lebur Senyawa Hasil Sintesis

Replikasi	Hasil Pengamatan (°C)	Rentang jarak lebur (°C)
1	241-243	241-243
2	241-243	
3	241-243	

Data yang diperoleh dari penentuan jarak lebur senyawa hasil sintesis seperti yang tertera di Tabel V.2 menunjukkan bahwa senyawa 4-bromobenzoilurea memiliki jarak lebur sebesar 241-243°C dengan rentang 2°C yang berarti bahwa senyawa hasil sintesis tersebut cukup murni secara jarak lebur (Pavia, 2009).

5.2.3 Analisis Kualitatif Dengan Kromatografi Lapis Tipis

Untuk melihat ada atau tidaknya pengotor dari hasil samping reaksi sintesis, dilakukan analisis dengan metode kromatografi lapis tipis menggunakan tiga macam fase gerak. Hasil analisis harga R_f dari kromatografi lapis tipis senyawa 4-bromobenzoilurea hasil sintesis tertera pada Tabel V.3.

Tabel V.3
Nilai R_f Senyawa 4-Bromobenzoilurea Hasil Sintesis dalam Tiga Macam Fase Gerak

Fase Gerak	Nilai R_f Senyawa	
	4-bromobenzoilurea	4-Bromobenzoil klorida
1	0,3	0,15
2	0,45	0,2
3	0,55	0,25

Keterangan:

- Fase diam : Silika Gel 60 GF₂₅₄
- Penampak noda : Lampu UV 254 nm
- Pelarut : Etanol
- Fase Gerak 1 : Kloroform : etil asetat = 7 : 3
- Fase Gerak 2 : Kloroform : aseton = 7 : 3
- Fase Gerak 3 : Kloroform : etil asetat : aseton = 1 : 2 : 1

$$\text{Nilai Rf} = \frac{\text{Jarak yang ditempuh oleh zat (cm)}}{\text{Jarak yang ditempuh oleh eluen (cm)}}$$

Melalui analisis kromatografi lapis tipis dengan menggunakan tiga macam fase gerak yang berbeda diketahui bahwa senyawa 4-bromobenzoilurea hasil sintesis memiliki nilai Rf yang baik dan nodanya tunggal berwarna ungu, sehingga dapat disimpulkan senyawa tersebut murni secara KLT.

5.2.4 Analisis Kualitatif Dengan Spektrofotometer UV-Vis

Untuk mengetahui pola spektra dari suatu senyawa dilakukan analisis kualitatif dengan spektrofotometer UV-Vis. Selain itu, analisis dengan spektrofotometer Uv-Vis dapat digunakan untuk mengetahui adanya pergeseran puncak serapan maksimum dari senyawa awal 4-bromobenzoil klorida dan dibandingkan dengan senyawa 4-bromobenzoilurea hasil sintesis. Melalui analisis ini diperoleh spektra dari senyawa awal 4-bromobenzoil klorida dan senyawa 4-bromobenzoilurea seperti yang terlihat pada Gambar 5.1 dan Gambar 5.2.

Pada spektra senyawa 4-bromobenzoil klorida (Gambar 5.1) terlihat bahwa ada serapan maksimum pada panjang gelombang 240,6 nm sedangkan pada spektra senyawa 4-bromobenzoilurea (Gambar 5.2) diketahui bahwa terdapat serapan maksimum pada panjang gelombang 245,8 nm. Jadi, dapat disimpulkan bahwa telah terjadi perubahan dari senyawa awal 4-bromobenzoil klorida karena telah terjadi pergeseran puncak serapan maksimum.

5.3 Konfirmasi Struktur Senyawa Hasil Sintesis dan Pembandingan Dengan Spektrofotometer IR

Untuk mengetahui adanya gugus-gugus fungsi tertentu dari suatu senyawa dapat dilakukan konfirmasi dengan menggunakan spektrometer Inframerah. Spektra inframerah dari senyawa awal 4-bromobenzoil klorida dan senyawa 4-bromobenzoilurea hasil sintesis dapat dilihat pada Gambar 5.3 dan Gambar 5.4. Kemudian, analisis karakteristik spektra inframerah dari gugus-gugus fungsi yang ada pada senyawa awal dan senyawa hasil sintesis dapat dilihat pada Tabel V.4. Spektra inframerah dari senyawa pembandingan benzoilurea dapat dilihat pada Gambar 5.5 dan analisisnya pada Tabel V.5.

Tabel V.5
Perbandingan Spektra IR Senyawa Benzoilurea yang digunakan Uji
Aktivitas Analgesik dengan Senyawa Benzoilurea Siswandono, 1999

Benzoilurea (Siswandono, 1999)	Benzoilurea	Gugus fungsi	Pustaka (Pavia, 2009) (Solomon, 2011)
ν (cm⁻¹)	ν (cm⁻¹)		ν (cm⁻¹)
3366 dan 3227	3366 dan 3228	-NH ₂ amida	3350 dan 3180
3366	3366	-NH amida	3300
1660	1666	-C=O	1680-1630
Daerah Sidik Jari			
1610 dan 1477	1614 dan 1475	-C=C- aromatis	1600 dan 1475
-	-	Substituen <i>p</i> -	800-860

Dengan melihat perbandingan pada Tabel V.4, dapat dilihat bahwa terdapat perbedaan di antara senyawa awal 4-bromobenzoil klorida dan senyawa 4-bromobenzoilurea hasil sintesis. Puncak karakteristik pada senyawa 4-bromobenzoilurea di bilangan gelombang 3369,19 dan 3236,28 cm⁻¹ yang menunjukkan adanya gugus fungsi amina primer dan pada bilangan gelombang 3333,19 cm⁻¹ yang menunjukkan adanya gugus fungsi amina sekunder, sedangkan pada senyawa awal 4-bromobenzoil klorida tidak ada. Pada spektra IR senyawa benzoilurea yang digunakan pada penelitian ini dapat dilihat bahwa memiliki puncak karakteristik yang sama dengan senyawa benzoilurea milik Siswandono, 1999. Spektra IR senyawa 4-bromobenzoilurea dan benzoilurea (Siswandono, 1999) terlampir pada lampiran 10 dan 11.

5.4 Uji Aktivitas Analgesik

Pengamatan terhadap frekuensi geliat mencit putih (*Mus musculus*) dilakukan untuk mengetahui aktivitas analgesik dari suatu senyawa. Pengujian dilakukan dengan empat kelompok, kelompok uji dengan

pemberian senyawa 4-bromobenzoilurea hasil sintesis, dua kelompok pembanding senyawa induk benzoilurea dan asam asetil salisilat masing-masing diberikan pada dosis 50 mg/kg BB, 100 mg/kg BB dan 200 mg/kg BB serta kelompok kontrol suspensi CMC-Na 0,5 %.

5.4.1 Penentuan Frekuensi Geliat

Geliatan pada mencit terjadi sebagai respon nyeri akibat diberikannya penginduksi nyeri larutan asam asetat 0,6% dengan dosis 0,01 ml/g BB mencit setelah 20 menit pemberian suspensi senyawa uji 4-bromobenzoilurea, senyawa pembanding asam asetil salisilat dan senyawa induk benzoilurea pada dosis 50 mg/kg BB, 100 mg/kg BB, dan 200 mg/kg BB serta kontrol CMC-Na 0,5%. Lalu frekuensi geliatan yang terjadi pada tiap ekor mencit diamati selama 30 menit. Hasil pengamatan terhadap respon nyeri dapat dilihat pada Tabel V.6

Tabel V.6
Frekuensi Geliat Pada Kelompok Uji 4-Bromobenzoilurea, Kelompok
Pembanding Benzoilurea dan Asam Asetil Salisilat serta Kelompok
Kontrol CMC-Na 0,5 %

No.	Frekuensi Geliatan									Kontr ol CMC- Na
	Kelompok uji			Kelompok Pembanding						
	4-Bromo Benzoilurea			Benzoilurea			Asam asetil salisilat			
	50	10 0	200	50	10 0	200	50	100	200	
1.	59	37	30	40	29	18	40	25	13	68
2.	51	35	31	50	35	26	44	26	13	69
3.	62	41	29	55	38	33	47	29	16	69
4.	53	42	35	58	40	35	48	31	17	70
5.	48	37	29	62	45	39	49	31	17	70
6.	52	39	28	62	48	41	53	33	18	72
Rat a- rata	54,1 7	38, 5	30,3 3	54, 5	39 ,1 7	32	46,8 3	29,1 7	15,6 7	69,6
SD	5,27	2,6 6	2,50	8,4	6, 8	8,6	4,45	3,13	2,16	1,37

Dari data yang tertera pada Tabel V.6 diketahui bahwa frekuensi geliat pada mencit kelompok uji dan pembanding lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hal ini dapat disimpulkan senyawa benzoilurea dan senyawa 4-bromobenzoilurea mempunyai aktivitas analgesik.

5.4.2 Analisis Data Dengan *One-way ANOVA*

Analisis dengan *one-way ANOVA* dilakukan untuk mengetahui adanya perbedaan bermakna pada frekuensi geliat antar kelompok dosis senyawa uji, dua senyawa pembanding dan kelompok kontrol. *ANOVA* dilaksanakan dengan bantuan *software* komputer SPSS 13.0. Dari hasil *ANOVA* diperoleh harga F hitung 54,329 dan p sebesar 0,000 (lampiran 3).

Harga F yang diperoleh tersebut kemudian dibandingkan dengan harga F tabel untuk (9,50) sebesar 2,07; dimana F hitung memiliki harga lebih besar daripada F tabel dan harga probabilitas (p) memiliki harga 0,000 yang dinilai lebih kecil daripada 0,05 pada $\alpha = 0,05$. Jadi, dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna frekuensi geliat antar kelompok dosis senyawa uji 4-bromobenzoilurea, kelompok dosis senyawa induk benzoilurea, kelompok dosis asam asetil salisilat dan kelompok kontrol CMC-Na. Untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna antar masing-masing kelompok perlakuan maka dilakukan uji LSD juga dengan bantuan *software* program komputer SPSS 13.0 dengan hasil lengkapnya dapat dilihat pada lampiran 4 dengan ringkasan pada Tabel V.7

Tabel V.7
***Post-Hoc Tests* Antar Kelompok Perlakuan Senyawa Pembanding Asam Asetil Salisilat, Senyawa Uji 4-Bromobenzoilurea, Senyawa Pembanding Benzoilurea dan Kontrol CMC-Na**

(I) Kelompok	(J) Kelompok	<i>Mean Difference (I-J)</i>
4-Bromobenzoilurea	Benzoilurea	-0,889
	Asetosal	10,444(*)
	Kontrol cmc-Na	-28,667(*)
Benzoilurea	4-Bromobenzoilurea	0,889
	Asetosal	11,333(*)
	Kontrol cmc-Na	-27,778(*)
Asetosal	4-Bromobenzoilurea	-10,444(*)
	Benzoilurea	-11,333(*)
	Kontrol cmc-Na	-39,111(*)
Kontrol cmc-Na	4-Bromobenzoilurea	28,667(*)
	Benzoilurea	27,778(*)
	Asetosal	39,111(*)

Dari hasil analisis di atas dapat disimpulkan bahwa, senyawa uji 4-bromobenzoilurea memiliki aktivitas analgesik yang tidak berbeda bermakna atau sama dengan senyawa induk benzoilurea, namun disisi lain terdapat perbedaan bermakna antara aktivitas analgesik senyawa uji 4-bromobenzoilurea dengan asam asetil salisilat dan kelompok kontrol CMC-Na.

5.4.3 Perhitungan Persentase Hambatan Nyeri

Data dari frekuensi geliat setiap kelompok perlakuan senyawa uji 4-bromobenzoilurea, senyawa pembanding benzoilurea dan asam asetil salisilat serta kontrol CMC-Na dapat dihitung persentase hambatan nyeri seperti yang dapat dilihat pada Tabel V.8 dengan cara perhitungannya dapat dilihat pada lampiran 5.

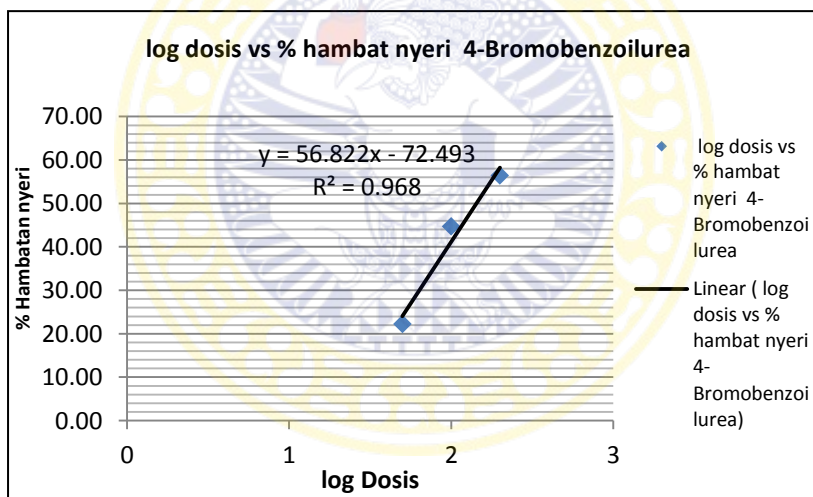
Tabel V.8
Persentase Hambatan Nyeri Kelompok Senyawa Uji 4-Bromobenzoilurea, Senyawa Pembanding Benzoilurea dan Asam Asetil Salisilat

Dosis	Rata-rata frekuensi geliat			Rerat kelompok Kontrol	% Hambatan nyeri		
	4-Bromobenzoilurea	Benzoilurea	Asam Asetil salisilat		4-Bromobenzoilurea	Benzoilurea	Asam Asetil salisilat
50	54,17	54,5	46,83	69,67	22,25	21,77	32,78
100	38,5	39,17	29,17		44,74	43,78	58,13
200	30,33	32	15,67		56,46	54,07	77,51

Dari Tabel V.8 dapat diperoleh persamaan regresi linier dan kurva hubungan antara log dosis vs % hambatan nyeri untuk senyawa uji 4-bromobenzoilurea hasil sintesis ataupun senyawa pembanding benzoilurea dan asam asetil salisilat.

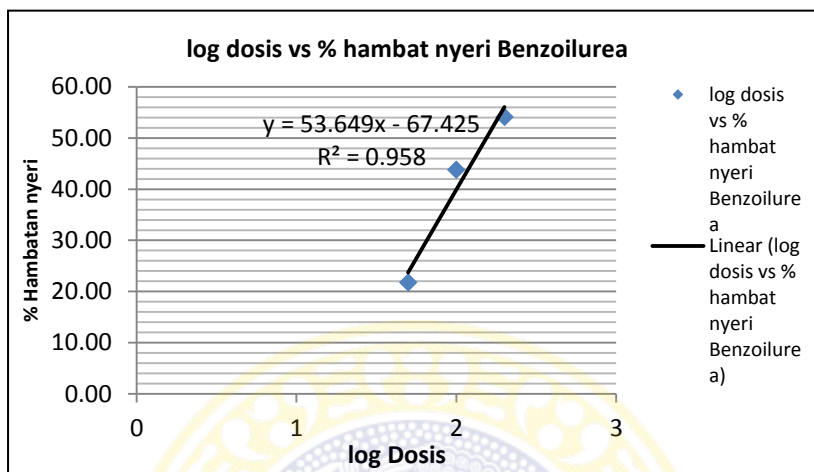
5.4.4 Penentuan ED₅₀

Untuk memperoleh ED₅₀ aktivitas analgesik suatu senyawa diperlukan persamaan regresi linier hubungan antara log dosis vs % hambatan nyeri seperti yang tampak pada Gambar 5.6, Gambar 5.7, dan Gambar 5.8



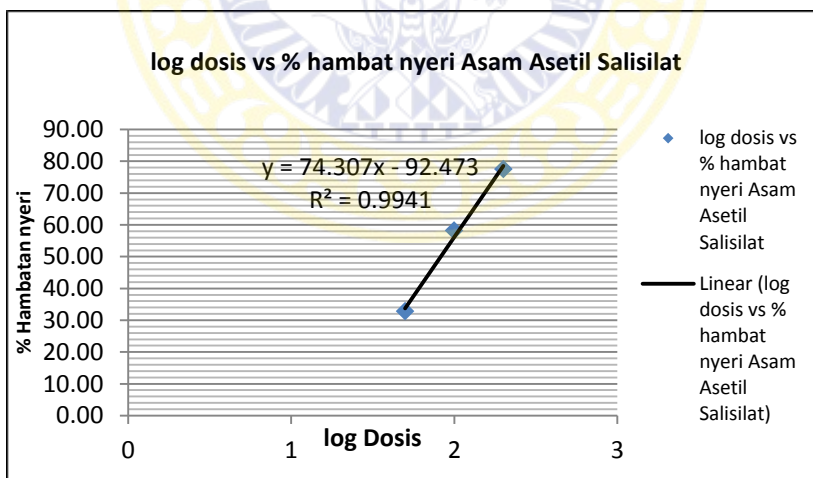
Gambar 5.6 Kurva Hubungan Antara log Dosis Vs % Hambatan Nyeri Senyawa Uji 4-Bromobenzoilurea

Persamaan regresi linier $y = 56,82x - 72,49$ dengan $r = 0,9839$



Gambar 5.7 Kurva Hubungan Antara log Dosis Vs % Hambatan Nyeri Senyawa Pembanding Benzoilurea

Persamaan regresi linier $y = 53,64x - 67,42$ dengan $r = 0,9783$



Gambar 5.8 Kurva Hubungan Antara log Dosis Vs % Hambatan Nyeri Senyawa Pembanding Asam Asetil Salisilat

Persamaan regresi linier $y=74,30x - 92,47$ dengan $r=0,9970$

Persamaan regresi linier senyawa asam asetil salisilat yang memiliki harga r lebih besar daripada r tabel (0,997) untuk $n=3$ berarti bahwa ada hubungan yang linier antara log dosis dengan % hambatan nyeri. Disisi lain, untuk persamaan regresi senyawa 4-bromobenzoilurea dan benzoilurea yang mempunyai harga r hitung lebih kecil daripada r tabel berarti hubungan antara log dosis dan % hambatan nyeri tidak linier. Selanjutnya, persamaan-persamaan di atas akan digunakan untuk menentukan ED_{50} . Hasil perhitungan ED_{50} masing-masing senyawa dapat dilihat pada Tabel V.9 dan cara perhitungannya terlampir pada lampiran 6.

Tabel V.9
 ED_{50} Aktivitas Analgesik Senyawa Uji 4-Bromobenzoilurea, Benzoilurea dan Asam Asetil Salisilat

Senyawa	ED_{50} (mg/kg BB)	ED_{50} (mmol/kg BB)
4-Bromobenzoilurea	143,14	0,5889
Benzoilurea	154,54	0,9414
Asam Asetil Salisilat	82,70	0,4590

BAB VI

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini telah berhasil dilakukan sintesis senyawa 4-bromobenzoilurea melalui reaksi asilasi *Schotten-Baumann* dengan penambahan basa trietilamin untuk menetralkan HCl pada hasil samping reaksi. Namun persentase senyawa hasil sintesis yang diperoleh sebesar 3,69 %; hal ini dapat disebabkan karena banyaknya rekristalisasi sampai empat kali pada tahap pemurnian sehingga banyak kristal yang mungkin masih terlarut dalam pelarut. Untuk mendapatkan hasil yang lebih optimal perlu dilakukan penelitian lanjutan seperti pemilihan pelarut, jumlah pelarut, dan jumlah basa yang ditambahkan saat mereaksikan bahan awal.

Senyawa hasil sintesis yang diperoleh dilihat secara visual yakni pemeriksaan organoleptis dan uji kemurnian dengan menentukan jarak lebur serta metode Kromatografi Lapis Tipis. Dilihat secara visual senyawa 4-bromobenzoilurea hasil sintesis memiliki bentuk kristal jarum kecil berwarna putih dan tidak berbau. Uji kemurnian yang dilakukan dengan menentukan jarak lebur menggunakan alat *Melting Point Apparatus* (Fischer-Johns) telah diperoleh jarak lebur senyawa 4-bromobenzoilurea hasil sintesis sebesar 241-243°C. Jarak lebur senyawa hasil sintesis yang memiliki rentang 2°C menunjukkan bahwa senyawa 4-bromobenzoilurea hasil sintesis cukup murni secara jarak lebur.

Uji kemurnian lainnya yang dilakukan untuk mendeteksi adanya pengotor ialah Kromatografi Lapis Tipis yang dilakukan dengan tiga fase gerak yang berbeda menggunakan fase diam silika gel 60 GF₂₅₄ dan penampak noda lampu UV 254 nm. Fase gerak pertama kloroform : etil asetat (7:3) memiliki R_f sebesar 0,3 cm; Fase Gerak kedua kloroform :

aseton (7:3) mempunyai R_f sebesar 0,45 cm; sedangkan pada fase Gerak ketiga kloroform : etil asetat : aseton (1:2:1) memiliki R_f sebesar 0,55 cm. Ketiga fase gerak yang digunakan merupakan hasil dari optimasi. Dari hasil uji Kromatografi Lapis Tipis tersebut menunjukkan bahwa noda yang dihasilkan hanya satu noda berwarna ungu sehingga senyawa 4-bromobenzoilurea hasil sintesis merupakan senyawa tunggal. Apabila dibandingkan dengan senyawa awal 4-bromobenzoil klorida harga R_f -nya berbeda, sehingga dapat diketahui ada perubahan yang telah terjadi. Jadi dapat disimpulkan bahwa senyawa 4-bromobenzoilurea hasil sintesis murni secara KLT.

Setelah diketahui senyawa hasil sintesis murni, dilakukan analisis kualitatif dengan spektrofotometer UV-Vis dan spektrofotometer Inframerah. Spektrofotometer UV-Vis digunakan untuk mengetahui adanya pergeseran serapan maksimum pada panjang gelombang maksimum. Spektra yang diperoleh dari analisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis menunjukkan adanya pergeseran puncak serapan maksimum dari senyawa awal 4-bromobenzoil klorida pada panjang gelombang 240,6 nm sedangkan untuk senyawa 4-bromobenzoilurea hasil sintesis pada panjang gelombang 245,8 nm menandakan adanya perubahan dari senyawa awal menjadi senyawa produk hasil sintesis.

Analisis dengan spektrofotometer Inframerah digunakan untuk mengkonfirmasi struktur senyawa 4-bromobenzoilurea hasil sintesis dengan adanya pola spektra karakteristik dari gugus-gugus fungsi tertentu. Adanya perbedaan pola spektra karakteristik seperti halnya gugus fungsi – NH_2 amida yang ditunjukkan dengan serapan pada bilangan gelombang 3369 cm^{-1} dan 3236 cm^{-1} serta –NH amida pada 3333 cm^{-1} sedangkan pada profil spektra senyawa 4-bromobenzoil klorida tidak terlihat. Namun

sebaliknya, pada profil spektra senyawa 4-bromobenzoil klorida terlihat serapan pada bilangan gelombang 1774 cm^{-1} yang menandakan adanya gugus asil klorida sedangkan pada profil spektra senyawa 4-bromobenzoilurea tidak terlihat. Hal ini menandakan bahwa telah terjadi perubahan gugus fungsi dari senyawa awal 4-bromobenzoil klorida menjadi 4-bromobenzoilurea yang sudah terkonfirmasi strukturnya.

Dilakukan uji aktivitas analgesik setelah senyawa 4-bromobenzoilurea hasil sintesis sudah terkonfirmasi. Metode uji aktivitas analgesik yang digunakan pada penelitian ini adalah *writhing test* dengan cara penghambatan nyeri akibat induksi kimia larutan asam asetat yang diberikan secara intraperitoneal pada mencit putih (*Mus musculus*). Metode ini terpilih karena lebih reproduibel, sederhana dan lebih mudah pelaksanaan serta pengamatannya.

Aktivitas analgesik ditentukan dengan mengamati frekuensi geliat pada mencit setelah pemberian senyawa yang akan diuji secara intraperitoneal lalu 20 menit kemudian diberikan larutan asam asetat sebagai penginduksi nyeri. Setelah pemberian senyawa yang akan diujikan ditunggu selama 20 menit dengan harapan senyawa tersebut sudah mencapai sel target dan onset of actionnya lalu dilakukan pengamatan frekuensi geliat selama 30 menit berselang 5 menit setelah pemberian penginduksi nyeri larutan asam asetat. Masing-masing senyawa yang diujikan dibagi menjadi tiga dosis berbeda yakni 50 mg/kg BB, 100 mg/kg BB dan 200 mg/kgBB.

Dari data frekuensi geliat yang diperoleh dapat dilihat bahwa semakin besar dosis senyawa 4-bromobenzoilurea hasil sintesis yang diberikan semakin rendah pula frekuensi geliat yang terjadi dan bila dibandingkan dengan kelompok kontrol, frekuensi geliat kelompok uji

selalu lebih kecil. Hal ini menandakan senyawa uji 4-bromobenzoilurea hasil sintesis memiliki aktivitas analgesik. Bila kelompok uji senyawa 4-bromobenzoilurea dibandingkan dengan kelompok pembanding senyawa induk benzoilurea, memiliki frekuensi geliatan yang lebih rendah sehingga senyawa 4-bromobenzoilurea lebih kuat sifat analgesiknya dibandingkan senyawa induk.

Selanjutnya, apabila kelompok uji senyawa 4-bromobenzoilurea hasil sintesis dibandingkan dengan kelompok pembanding asam asetil salisilat hasilnya frekuensi geliat pada kelompok uji lebih besar dibanding kelompok pembanding asam asetil salisilat. Hal ini menandakan bahwa sifat analgesik senyawa 4-bromobenzoilurea hasil sintesis lebih rendah dibandingkan asam asetil salisilat.

Untuk mengetahui adanya perbedaan aktivitas analgesik yang bermakna dari setiap kelompok uji, kelompok pembanding dan kelompok kontrol maka dilakukan uji *one-way ANOVA* yang dilakukan dengan bantuan *software* komputer SPSS 13.0 dari hasil analisis tersebut diperoleh harga F hitung sebesar 54,329 dan p sebesar 0,000 (lampiran 3). Harga F yang diperoleh tersebut kemudian dibandingkan dengan harga F tabel untuk (9,50) pada $\alpha = 0,05$ adalah 2,07 (lampiran 7). Dari data tersebut menunjukkan bahwa harga F hitung nilainya lebih besar daripada harga F tabel dan harga p menunjukkan probabilitas dimana harganya lebih kecil dari 0,05 pada $\alpha = 0,05$. Maka ada perbedaan bermakna frekuensi geliat antar kelompok dosis senyawa uji 4-bromobenzoilurea, senyawa pembanding benzoilurea, asam asetil salisilat dan kontrol CMC-Na. Jadi, dapat dinyatakan bahwa senyawa 4-bromobenzoilurea memiliki aktivitas analgesik.

Untuk mengetahui adanya perbedaan bermakna dari masing-masing perlakuan dilakukan uji LSD dengan bantuan program *software* komputer SPSS 13.0. Hasil uji LSD menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan bermakna atau sama aktivitas analgesik dari senyawa uji 4-bromobenzoilurea dengan senyawa pembanding benzoilurea sedangkan terhadap senyawa pembanding asam asetil salisilat dan kontrol CMC-Na terdapat perbedaan yang bermakna. Hal ini berarti bahwa senyawa 4-bromobenzoilurea hasil sintesis memiliki aktivitas analgesik yang sama dengan senyawa induk benzoilurea namun aktivitas analgesiknya lebih rendah dibandingkan dengan asam asetil salisilat.

Dari data frekuensi geliatan dapat diperoleh persentase hambatan nyeri. Setelah didapatkan persentase hambatan nyeri pada berbagai dosis senyawa kemudian dapat ditentukan ED_{50} yang dihitung melalui persamaan regresi linier yang diperoleh dari hubungan log dosis vs persentase hambatan nyeri. Untuk persamaan regresi linier dari senyawa pembanding asam asetil salisilat memiliki harga r hitung lebih besar dibanding r tabel (0,997) untuk $n = 3$ sehingga diperoleh ED_{50} senyawa asam asetil salisilat sebesar 82,70 mg/kg BB.

Namun, untuk senyawa uji 4-bromobenzoilurea dan pembanding benzoilurea memiliki harga r hitung kurang dari harga r tabel (0,997) untuk $n = 3$ yang berarti hubungan antara log dosis dan % hambatan nyeri kurang linier. Hal ini disebabkan oleh beberapa faktor seperti perbedaan genetik, dan profil metabolisme tubuh yang berbeda. Apabila harga ED_{50} dari senyawa uji 4-bromobenzoilurea dan pembanding benzoilurea tetap dihitung dari kedua senyawa tersebut maka berturut-turut 143,14 dan 154,54 mg/kg BB. Apabila dilihat dari ED_{50} dari ketiga senyawa maka dapat disimpulkan aktivitas analgesik 4-bromobenzoilurea sedikit lebih tinggi

dibanding senyawa induk benzoilurea namun lebih rendah dibanding asam asetil salisilat.

Perbedaan yang terjadi di antara senyawa 4-bromobenzoilurea hasil sintesis dan senyawa induk benzoilurea disebabkan karena adanya penambahan gugus bromo pada posisi 4 cincin aromatis menyebabkan senyawa memiliki sifat lipofilisitas, elektronik dan sterik yang meningkat. Lipofilisitas yang tinggi akan mempermudah senyawa untuk menembus membran bilayer, sifat elektronik yang tinggi juga akan memperbaiki interaksi senyawa dengan reseptor serta sifat sterik yang lebih tinggi juga akan mempengaruhi keserasian interaksi senyawa dengan reseptor.

Pembuktian sifat lipofilik, sterik dan elektronik yang meningkat dapat ditinjau dari harga ClogP, CMR dan σ dengan bantuan software ChemBioDraw 12.0 dari masing-masing senyawa. Senyawa induk benzoilurea memiliki harga ClogP sebesar 1,015; CMR sebesar 4,025 dan $\sigma_H = 0,00$. Modifikasi struktur senyawa induk dengan penambahan substituen bromo pada posisi para- mempengaruhi sifat fisika dan kimia senyawa seperti ClogP menjadi 2,079; CMR menjadi 5,202 dan $\sigma_{Br} = 0,23$.

Disisi lain, perbedaan aktivitas yang terjadi antara senyawa uji 4-bromobenzoilurea hasil sintesis dan senyawa induk benzoilurea dengan pembandingan asam asetil salisilat telah diprediksi sebelumnya dengan melakukan penelitian pendahuluan studi *in silico*. Studi *in silico* ini dilakukan *docking* dengan menggunakan program komputer Molegro Virtual Docker versi 5. Dari hasil penelitian pendahuluan di atas dapat terprediksi bahwa senyawa 4-bromobenzoilurea memiliki aktivitas analgesik yang sedikit lebih tinggi dibanding senyawa induk benzoilurea, namun lebih rendah dari aktivitas analgesik asam asetil salisilat.

Hasil uji aktivitas yang ada pada penelitian ini dapat menjadi dasar untuk penelitian lebih lanjut mengenai senyawa 4-bromobenzoilurea sebagai calon obat analgesik baru. Sebagai calon obat analgesik baru juga perlu diperhitungkan tentang efek toksik, profil farmakokinetik maupun farmakodinamik dari senyawa tersebut dalam rangka pengembangan obat baru.



BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa:

1. Senyawa 4-bromobenzoilurea mempunyai aktivitas analgesik pada mencit putih (*Mus musculus*) dengan metode *writhing test*.
2. Aktivitas analgesik senyawa 4-bromobenzoilurea sama besar dengan aktivitas benzoilurea pada mencit putih (*Mus musculus*) dengan metode *writhing test*.
3. Aktivitas analgesik senyawa 4-bromobenzoilurea hasil sintesis lebih rendah dari aktivitas analgesik asam asetil salisilat pada mencit putih (*Mus musculus*) dengan metode *writhing test*.

7.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka disarankan:

1. Dioptimasi lebih lanjut mengenai proses sintesis yang akan dilakukan saat mereaksikan bahan-bahan awal agar dapat diperoleh rendemen yang lebih banyak.
2. Dilaksanakan penelitian lebih lanjut mengenai efek toksik, profil farmakokinetik dan farmakodinamik mengenai senyawa 4-bromobenzoilurea.

DAFTAR PUSTAKA

- Alagarsamy V, Rajesh R, Ramaseshu M, Vijaykumar S, Ramaseshu K. V., and Duraianandakumar T., 2004. Synthesis, analgesic, anti-inflammatory and antibacterial activities of some novel 2-methylthio-3-substituted quinazolin-4(3H)-ones. *Bio Pharm Bull.* 27, 652-656.
- Budiati, T., Suzana dan Surdijati, S., 2010. Sintesis, uji aktivitas analgesik dan antiinflamasi senyawa benzoiltiourea tersubstitusi. *Majalah Farmasi Indonesia*, 21(1), 68 – 76.
- Burke, A., Smyte E., Fitz Gerald G. A., 2006. *Analgesic-antipyretic agents; pharmacotherapy of gout. In: Brunton, L.L (eds). Goodman and Gilman's The Pharmacological Basic of Therapeutics.* Ed. 11st. New York: McGraw-Hill. Ch. 26.
- Clayden, Greeves, Warren & Wothers, 2012, *Organic Chemistry*, 2nd ed., Oxford University Press, New York.
- Domer, F. R., 1971. *Animal Experiment In Pharmacological Analysis.* Springfield: Charles Thomas Publisher.
- Dyah, N. W., Purwanto, B. T., dan Susilowati, R., 2002. Uji Aktivitas Analgesik Senyawa Asam o-(4-butylbenzoyl)salisilat Hasil Sintesis Pada Mencit. *Laporan Penelitian*, Surabaya: Lembaga Penelitian Universitas Airlangga.
- Fessenden, R. J., dan Fessenden, J. S., 1995. *Dasar-dasar Kimia Organik.* Diterjemahkan oleh Maun, S. Jakarta: Binarupa Aksara.
- Furst, D.E. and Ulrich, R.W., 2007. *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, disease-modifying antirheumatic drugs, nonopioid analgesic & drugs used in gout. In: Katzung, B.G., (Eds). Basic and Clinical Pharmacology.* Ed 10th. New York: McGraw-Hill. pp. 573-599.

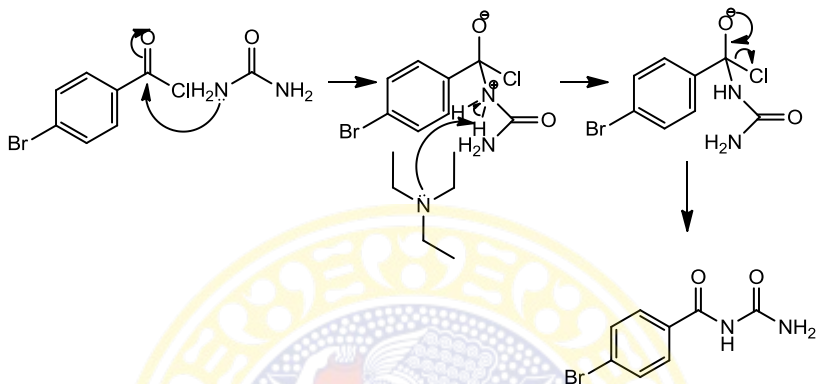
- Hardjono, S., 2013. Sintesis dan Uji Aktivitas Antikaner Senyawa 1-(2-klorobenzoiloksi)urea dan 1-(4-klorobenzoiloksi)urea. **Berkala Ilmiah Kimia Farmasi**, Vol.2 No. 1 Juni 2013.
- Kachhadia V. V., Patel M. R., and Joshi H. S., 2004.. Heterocyclic system containing S/N regioselective nukleophilic competition: facile synthesis, antitubercular and antimicrobial activity of thiohydantoins and iminothiazolidinones containing the benzo[b]thiophene moiety. **J Serb Chem Soc.** 70, 2, 153-161.
- Katzung B. G., Masters, S. B., dan Trevor, A. J., 2012. **Basic & Clinical Pharmacology**, 12th Ed. United States : Lange The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Kossakowski J., and Struga M. Synthesis of thiourea derivates of 1H-Isoindol-1,3(2H)-dione as potential antiviral agents. **Ann Univ Mariae Currie-Sklodowska Lublin-Polonia.**, 2006; 111, 186-191.
- Limban, C., Chifriuc, M. C. B, Missir, A. V, Chirita I. C, and Bleotu C., 2008. Antimicrobial activity of some new thioureides devided from 2-(4-chlorophenoxymethyl)benzoic acids, part 13, [Online] <http://www.mdpi.org/molecules.com>. [2008, March 4]
- McMurry JM, 2015. **Organic Chemistry**. Cornell University, 9th Ed., Monterey, California : Thomson Brokes/Cole Publishing Company.
- Mulya, M., dan Suharman, 1995. **Analisis Instrumental**. Surabaya : Airlangga University Press
- National Institutes on Drug Abuse, 2011. Facts on CNS Depressants. U.S. Department of Health and Human Services.
- Pavia D. L., Lampman G. M., Kriz G. S., 2009. **Introduction to Spectroscopy**, 4th Ed., Departement of Chemistry Western Washington University, Bellingham Washington, Thomson Brookes/Cole, Belmont, USA.

- Purwanto, B. T., 2013. Perbandingan Aktivitas Penekan Susunan Saraf Pusat Senyawa Baru N-benzoilfenilurea dan 4-nitrobenzoilfenilurea. **Berkala Ilmiah Kimia Farmasi**, Vol.2 No. 2 November 2013.
- Rahman, A. U., Choudary, M. I., dan Thomsen, W. J., 2005. **Bioassay Techniques For Drug Development**. Harwood Academic Publishers.
- Silverstein R.M, Webster, F. X, Kiemle, D.J. 2005. **Spectrometric Identification of Organic Coumpound**, 7th edition. New York:John Willey and sons Inc.
- Siswandono., 1999. Modifikasi struktur dan hubungan struktur-aktivitas senyawa-senyawa baru turunan benzoilurea. **Disertasi**. Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga, Surabaya.
- Siswandono, Soekardjo, B., 2008. **Kimia Medisinal I**. Cetakan kedua. Surabaya: Airlangga University Press.
- Suzana, Budiati, T., dan Ekowati, J., 2004. Sintesis senyawa benzoiltiurea dan uji aktivitas sebagai penekan saraf pusat pada mencit (Mus musculus). **Laporan Penelitian**. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.
- Sweetman, C. S., 2009. **Martindale The Complete Drug Reference**. 36th Ed., England : The Pharmaceutical press.
- Tjay,Tan Hoan dan Rahardja, K., 2007. **Obat-obat Penting.**, Jakarta : PT Gramedia
- Turner, R. A., 1965. **Screening Method in Pharmacology**, Vol. I. New York: Academic Press.
- Vogel, G.H. Eds. 2008. **Drug Discovery and Evaluation: Safety and Pharmacokinetic Assays**. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Vogels, AI, 1986. *Textbook of Practical Organic Chemistry*. third ed. New York: Longman Group Ltd.

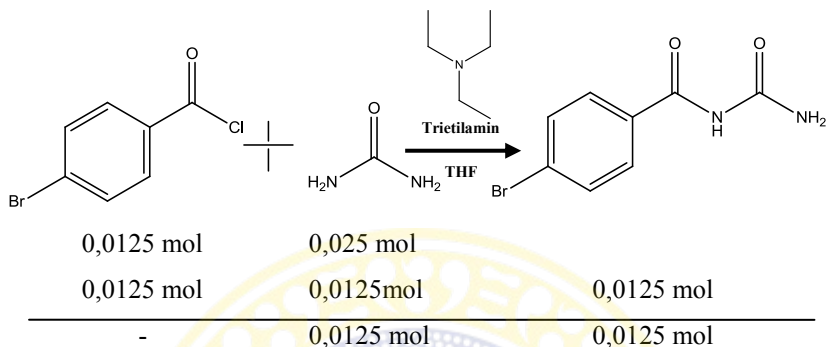




Lampiran 1**Mekanisme Reaksi Asilasi dengan Basa Trietilamin**

Lampiran 2

Perhitungan Persentase Senyawa Hasil Sintesis



Berat molekul senyawa 4 Bromobenzoilurea = 243,06

Berat senyawa hasil secara teoritis = $0,0125 \text{ mol} \times 243,06$
 = 3,038 g

Berat senyawa hasil sintesis = 0,112 g

Persentase hasil = $\frac{0,112 \text{ g}}{3,038 \text{ g}} \times 100 \%$
 = 3,69%

Lampiran 3**Hasil Analisis *one-way ANOVA*****Descriptives**

Geliat

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
brbu 50	6	54.17	5.269	2.151	48.64	59.70	48	62
brbu 100	6	38.50	2.665	1.088	35.70	41.30	35	42
brbu 200	6	30.33	2.503	1.022	27.71	32.96	28	35
bu 50	6	54.50	8.432	3.442	45.65	63.35	40	62
bu 100	6	39.17	6.853	2.798	31.97	46.36	29	48
bu 200	6	32.00	8.626	3.521	22.95	41.05	18	41
asetosal 50	6	46.83	4.446	1.815	42.17	51.50	40	53
asetosal 100	6	29.17	3.125	1.276	25.89	32.45	25	33
asetosal 200	6	15.67	2.160	.882	13.40	17.93	13	18
kontrol	6	69.67	1.366	.558	68.23	71.10	68	72
Total	60	41.00	15.695	2.026	36.95	45.05	13	72

Test of Homogeneity of Variances

Geliat

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.017	9	50	.006

ANOVA

Geliat

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	13185.667	9	1465.074	54.329	.000
Within Groups	1348.333	50	26.967		
Total	14534.000	59			

Lampiran 4**Hasil Analisis Uji LSD****Descriptives**

Geliat

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
brbu	18	41.00	10.754	2.535	35.65	46.35	28	62
bu	18	41.89	12.242	2.885	35.80	47.98	18	62
asetosal	18	30.56	13.509	3.184	23.84	37.27	13	53
kontrol	6	69.67	1.366	.558	68.23	71.10	68	72
Total	60	41.00	15.695	2.026	36.95	45.05	13	72

ANOVA

Geliat

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6908.444	3	2302.815	16.911	.000
Within Groups	7625.556	56	136.171		
Total	14534.000	59			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Geliat
LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
brbu	bu	-.889	3.890	.820	-8.68	6.90
	asetosal	10.444(*)	3.890	.010	2.65	18.24
	kontrol	-28.667(*)	5.501	.000	-39.69	-17.65
bu	brbu	.889	3.890	.820	-6.90	8.68
	asetosal	11.333(*)	3.890	.005	3.54	19.13
	kontrol	-27.778(*)	5.501	.000	-38.80	-16.76
asetosal	brbu	-10.444(*)	3.890	.010	-18.24	-2.65
	bu	-11.333(*)	3.890	.005	-19.13	-3.54
	kontrol	-39.111(*)	5.501	.000	-50.13	-28.09
kontrol	brbu	28.667(*)	5.501	.000	17.65	39.69
	bu	27.778(*)	5.501	.000	16.76	38.80
	asetosal	39.111(*)	5.501	.000	28.09	50.13

* The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran 5**Perhitungan % Hambatan Nyeri**

$$\% \text{ Hambatan nyeri} = \frac{fk-fu}{fk} \times 100\%$$

fk : rata-rata frekuensi geliat kelompok uji

fu : rata-rata frekuensi geliat kelompok kontrol

1. Senyawa uji 4-bromobenzoilurea

a. dosis 50 mg/kg BB

$$\% \text{ Hambatan nyeri} = \frac{69,67-54,17}{69,67} \times 100\% = 22,25 \%$$

b. dosis 100 mg/kg BB

$$\% \text{ Hambatan nyeri} = \frac{69,67-38,5}{69,67} \times 100\% = 44,74 \%$$

c. dosis 200 mg/kg BB

$$\% \text{ Hambatan nyeri} = \frac{69,67-30,33}{69,67} \times 100\% = 56,46 \%$$

2. Senyawa uji benzoilurea

a. dosis 50 mg/kg BB

$$\% \text{ Hambatan nyeri} = \frac{69,67-54,5}{69,67} \times 100\% = 21,77 \%$$

b. dosis 100 mg/kg BB

$$\% \text{ Hambatan nyeri} = \frac{69,67-39,17}{69,67} \times 100\% = 43,78\%$$

c. dosis 200 mg/kg BB

$$\% \text{ Hambatan nyeri} = \frac{69,67-32}{69,67} \times 100\% = 54,07 \%$$

3. Senyawa uji asamasetil salisilat

a. dosis 50 mg/kg BB

$$\% \text{ Hambatan nyeri} = \frac{69,67-46,83}{69,67} \times 100\% = 32,78 \%$$

b. dosis 100 mg/kg BB

$$\% \text{ Hambatan nyeri} = \frac{69,67-29,17}{69,67} \times 100\% = 58,13 \%$$

c. dosis 200 mg/kg BB

$$\% \text{ Hambatan nyeri} = \frac{69,67-15,67}{69,67} \times 100\% = 77,51 \%$$



Lampiran 6

Cara Perhitungan ED_{50}

ED_{50} = dosis efektif yang dapat menghambat nyeri sebesar 50 %

1. Senyawa uji 4-bromobenzoilurea

$$y = 56,82x - 72,49 \text{ dengan } r = 0,9839$$

$$50 = 56,82x - 72,49$$

$$x = \frac{50+72,49}{56,82}$$

$$x = 2,1558$$

$$ED_{50} = 10^{2,1558} = 143,14 \text{ mg/kg BB}$$

2. Senyawa pembanding benzoilurea

$$y = 53,64x - 67,42 \text{ dengan } r = 0,9783$$

$$50 = 53,64x - 67,42$$

$$x = \frac{50+67,42}{53,64}$$

$$x = 2,1890$$

$$ED_{50} = 10^{2,1890} = 154,54 \text{ mg/kg BB}$$

3. Senyawa pembanding asam asetil salisilat

$$y = 74,30x - 92,47 \text{ dengan } r = 0,9970$$

$$50 = 74,30x - 92,47$$

$$x = \frac{50+92,47}{74,30}$$

$$x = 1,9175$$

$$ED_{50} = 10^{1,9175} = 82,70 \text{ mg/kg BB}$$

Lampiran 7

Tabel F

p = 0,05 (di atas); p = 0,01 (di bawah)

(9, 50) → 2,07

V ₂	degree freedom of greater mean square (V ₁) derajat kebebasan untuk pembilang																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	16	20	24	30	40	50	
32	4,15	3,30	2,90	2,67	2,51	2,40	2,32	2,25	2,19	2,14	2,10	2,07	2,02	1,97	1,91	1,86	1,82	1,76	1,74	
	7,50	5,24	4,46	3,97	3,66	3,42	3,25	3,13	3,01	2,94	2,86	2,80	2,70	2,62	2,51	2,42	2,34	2,25	2,20	
34	4,13	3,28	2,88	2,65	2,49	2,38	2,30	2,23	2,17	2,12	2,08	2,05	2,00	1,95	1,89	1,84	1,80	1,74	1,71	
	7,44	5,29	4,42	3,93	3,61	3,38	3,21	3,08	2,97	2,89	2,82	2,76	2,66	2,58	2,47	2,38	2,30	2,21	2,15	
36	4,11	3,26	2,86	2,63	2,48	2,36	2,28	2,21	2,15	2,10	2,06	2,03	1,98	1,93	1,87	1,82	1,78	1,72	1,69	
	7,39	5,25	4,38	3,89	3,58	3,35	3,18	3,04	2,94	2,86	2,78	2,72	2,62	2,54	2,43	2,35	2,26	2,17	2,12	
38	4,10	3,25	2,85	2,62	2,46	2,35	2,26	2,19	2,14	2,09	2,05	2,02	1,96	1,92	1,85	1,80	1,76	1,71	1,67	
	7,35	5,21	4,34	3,86	3,54	3,32	3,15	3,02	2,91	2,82	2,75	2,69	2,59	2,51	2,40	2,22	2,22	2,14	2,08	
40	4,08	3,23	2,84	2,61	2,45	2,34	2,25	2,18	2,12	2,07	2,04	2,00	1,95	1,90	1,84	1,79	1,74	1,69	1,66	
	7,31	5,18	4,31	3,83	3,51	3,29	3,13	2,99	2,88	2,80	2,73	2,66	2,56	2,49	2,37	2,29	2,20	2,11	2,05	
42	4,07	3,22	2,83	2,59	2,44	2,32	2,24	2,17	2,11	2,06	2,02	1,99	1,94	1,89	1,82	1,78	1,73	1,68	1,64	
	7,27	5,15	4,29	3,80	3,49	3,26	3,10	2,96	2,86	2,77	2,70	2,64	2,54	2,46	2,35	2,26	2,17	2,06	2,02	
44	4,06	3,21	2,82	2,58	2,43	2,31	2,23	2,16	2,10	2,05	2,01	1,98	1,92	1,88	1,81	1,76	1,72	1,66	1,63	
	7,24	5,12	4,26	3,78	3,46	3,24	3,07	2,94	2,84	2,75	2,68	2,62	2,52	2,44	2,32	2,24	2,15	2,06	2,00	
46	4,05	3,20	2,81	2,57	2,42	2,30	2,22	2,14	2,09	2,04	2,00	1,97	1,91	1,87	1,80	1,75	1,71	1,65	1,62	
	7,21	5,10	4,24	3,76	3,44	3,22	3,05	2,92	2,82	2,73	2,66	2,60	2,50	2,42	2,30	2,22	2,13	2,04	1,98	
48	4,04	3,19	2,80	2,56	2,41	2,30	2,21	2,14	2,03	2,03	1,99	1,96	1,90	1,86	1,79	1,74	1,70	1,64	1,61	
	7,19	5,08	4,22	3,74	3,42	3,20	3,04	2,90	2,80	2,71	2,64	2,58	2,48	2,40	2,28	2,20	2,11	2,02	1,96	
50	4,03	3,18	2,79	2,56	2,40	2,29	2,20	2,13	2,07	2,02	1,98	1,95	1,90	1,85	1,78	1,74	1,69	1,63	1,60	
	7,17	5,06	4,20	3,72	3,41	3,18	3,02	2,88	2,73	2,70	2,62	2,56	2,46	2,39	2,26	2,18	2,10	2,00	1,94	

Sumber : Snedecor, George W dan Cochran, William G, 1980, *Statistical Methods seventh edition*, Ames Iowa USA : The Iowa State University Press

Lampiran 8

Tabel r

$p = 0,05$; $df = n-2 \rightarrow 1$ (r tabel = 0,997)

df	Tingkat Signifikansi untuk tes satu sisi			
	0,050	0,025	0,010	0,005
	Tingkat Signifikansi untuk tes dua sisi			
	0,100	0,050	0,020	0,010
1	0,988	0,997	0,9994	0,9999
2	0,900	0,950	0,980	0,990
3	0,805	0,878	0,934	0,959
4	0,729	0,811	0,882	0,917
5	0,669	0,754	0,833	0,874
6	0,622	0,707	0,789	0,834
7	0,582	0,666	0,750	0,798
8	0,549	0,632	0,716	0,765
9	0,521	0,602	0,685	0,735
10	0,497	0,576	0,658	0,708
11	0,476	0,553	0,634	0,684
12	0,458	0,532	0,612	0,661
13	0,441	0,514	0,592	0,641
14	0,426	0,497	0,574	0,623
15	0,412	0,482	0,558	0,606
16	0,400	0,468	0,542	0,590
17	0,389	0,456	0,528	0,575
18	0,378	0,444	0,516	0,561
19	0,369	0,433	0,503	0,549
20	0,360	0,423	0,492	0,537
21	0,352	0,413	0,482	0,526
22	0,344	0,404	0,472	0,515
23	0,337	0,396	0,462	0,505
24	0,330	0,388	0,453	0,496
25	0,323	0,381	0,445	0,487
26	0,317	0,374	0,437	0,479
27	0,311	0,367	0,430	0,471
28	0,306	0,361	0,423	0,463
29	0,301	0,355	0,416	0,456
30	0,296	0,349	0,409	0,449
35	0,275	0,325	0,381	0,418
40	0,257	0,304	0,358	0,393
45	0,243	0,288	0,338	0,372
50	0,231	0,273	0,322	0,354
60	0,211	0,250	0,294	0,325
70	0,195	0,232	0,274	0,303
80	0,183	0,217	0,256	0,283
90	0,173	0,205	0,242	0,267
100	0,164	0,195	0,230	0,254

Sumber : Nasir, Moh, 1985, *Metode Penelitian statistik pertama*, Jakarta : Ghalia Indonesia.

Lampiran 9

Foto Geliatan Mencit



Lampiran 12

Hasil Uji Etik Hewan Penelitian



KOMISI ETIK PENELITIAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
Animal Care and Use Committee (ACUC)

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
 * ETHICAL CLEARANCE *

No : 566-KE

KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
 FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA,
 TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
 DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA :

PENELITIAN BERJUDUL	: Uji Aktivitas Analgesik Senyawa 4-Bromo Benzocaine Hasil sintesis Pada Mencit Putih (<i>Mus musculus</i>) Dengan Metode Whiffing Test
PENELITI UTAMA	: Canindera Costa
UNIT/LEMBAGA/TEMPAT PENELITIAN	: Program Studi S1 Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
DINYATAKAN	: LAIK ETIK



Prof. Dr. Heryanto, M.Kes.,Dh.
NIP. 194901011986011001

Surabaya, 18 Mei 2016



Nusdianto Triakso, N.P.,Dh.
NIP. 196805051997021001